



UNIVERSITAT DE LES ILLES BALEARS
FACULTAT DE CIÈNCIES
DEPARTAMENT DE BIOLOGIA
Doctorat per la UIB de Microbiologia Ambiental
i Biotecnologia

**Estudio de la variabilidad genética, factores de
virulencia y mecanismos de invasión del epitelio
respiratorio humano durante la infección por
Haemophilus influenzae no tipable**

TESIS DOCTORAL

Antonio López Gómez

Palma, 2012

Directora: Dra. Juncal Garmendia García

Tesis Doctoral presentada por D. Antonio López Gómez para aspirar al grado de Doctor por la Universidad de las Islas Baleares.

D. Antonio López Gómez
(*Nombre del doctorando*)

La Dra. Juncal Garmendia García como directora, y el Dr. José Antonio Bengoechea Alonso como co-director, de la Tesis Doctoral titulada “Estudio de la variabilidad genética, factores de virulencia y mecanismos de invasión del epitelio respiratorio humano durante la infección por *Haemophilus influenzae* no tipable”, realizada en la Fundación de Investigación Sanitaria de las Islas Baleares (FISIB) por D. Antonio López Gómez, autorizan la presentación de la mencionada Tesis Doctoral puesto que reúne las condiciones necesarias para su defensa.

Dra. Juncal Garmendia García
(*Directora de la Tesis Doctoral*)

Dr. José Antonio Bengoechea Alonso
(*Co-director de la Tesis Doctoral*)

Dr. Jorge Lalucat Jo
(*Ponente de la Tesis Doctoral*)

Este trabajo de Tesis Doctoral ha sido realizado gracias al disfrute de una Beca Predoctoral de Personal Investigador Oferta Año 2008 (BOIB núm. 65 de 13/5/2008) Referencia FP108 4313370P asociada al proyecto:

- FIS (Fondo de Investigaciones Sanitarias) con referencia PS09-00130: "Disección molecular de la colonización del epitelio respiratorio por el patógeno bacteriano *Haemophilus influenzae* no tipable"

ÍNDICE GENERAL

ÍNDICE DE FIGURAS.....	9
ÍNDICE DE TABLAS.....	11
ABREVIATURAS.....	13
RESUMEN / ABSTRACT.....	18
INTRODUCCIÓN.....	23
1. BASES DE LA PATOGÉNESIS BACTERIANA.....	23
1.1. Factores de virulencia bacteriana.....	26
1.2. Papel de la modificación y del intercambio de material genético en la virulencia bacteriana.....	27
1.3. Moléculas del hospedador moduladas durante la infección bacteriana.....	28
1.3.1 Integrinas.....	28
1.3.2. <i>Carcinoembryonic antigen-related cell adhesion molecule</i> (CEACAM).....	30
1.3.3. Balsas lipídicas y rutas endocíticas.....	30
1.3.4. Citoesqueleto de la célula hospedadora.....	32
i) Citoesqueleto de actina.....	32
ii) Microtúbulos.....	32
iii) <i>Guanine triphosphatase</i> (GTPasas).....	33
1.3.5. Fosfoinosítidos.....	37
2. ESTRUCTURA Y CARACTERÍSTICAS GENERALES DEL TRACTO RESPIRATORIO.....	38
2.1. Inmunidad innata humoral y celular del tracto respiratorio.....	41
2.2. Microbiota normal del tracto respiratorio.....	46
2.3. Aspectos generales de la enfermedad pulmonar obstructiva crónica (EPOC).....	47
3. <i>Haemophilus influenzae</i> NO TIPABLE: UN PATOGENO OPORTUNISTA DEL TRACTO RESPIRATORIO HUMANO.....	48
3.1. Características generales de <i>Haemophilus influenzae</i>	48
3.2. Dualidad colonizador-patógeno de <i>Haemophilus influenzae</i>	49
3.3. Variabilidad genética de <i>H. influenzae</i>	52
3.4. Factores de virulencia y mecanismos de patogénesis de HiNT.....	54
3.4.1. El lipooligosacárido de HiNT: estructura, diversidad e implicación en virulencia.....	54

3.4.2. Resistencia de HiNT a la muerte mediada por péptidos antimicrobianos.....	61
3.4.3. Formación de biopelículas por HiNT.....	62
3.5. Elementos bacterianos y dinámica de la infección epitelial por HiNT.....	64
3.5.1. Moléculas implicadas en la interacción de HiNT en el epitelio respiratorio humano.....	65
3.5.2. Características de la interacción de HiNT con células respiratorias.....	68
HIPÓTESIS Y OBJETIVOS.....	71
MATERIAL Y MÉTODOS.....	75
1. CEPAS BACTERIANAS, MEDIOS Y CONDICIONES DE CULTIVO.....	76
2. INMUNODETECCIÓN DE PCho A PARTIR DE COLONIA (COLONY BLOT).....	76
3. EXTRACCIÓN, RESTRICCIÓN Y MODIFICACIÓN DE ADN.....	77
4. REACCIÓN DE LA POLIMERASA EN CADENA (PCR).....	78
5. TRANSFORMACIÓN QUÍMICA DE <i>E. coli</i>	79
6. TRANSFORMACIÓN DE <i>H. INFLUENZAE</i> MEDIANTE INDUCCIÓN DE LA COMPETENCIA NATURAL (MÉTODO M-IV).....	79
7. GENERACIÓN DE CEPAS MUTANTES DE HiNT.....	80
8. DETERMINACIÓN DE LA FORMACIÓN DE BIOPELÍCULAS POR HiNT MEDIANTE FLUJO CONTINUO.....	83
9. DETERMINACIÓN DE LA RESISTENCIA DE HiNT A PÉPTIDOS ANTIMICROBIANOS.....	84
10. ENSAYO DE AGREGACIÓN BACTERIANA.....	84
11. CULTIVO CELULAR, MANTENIMIENTO DE LÍNEAS CELULARES E INFECCIÓN DE CÉLULAS EN CULTIVO.....	85
12. TRANSFECCIONES TRANSITORIAS.....	89
13. TINCIÓN Y MICROSCOPIA DE FLUORESCENCIA.....	91
14. MICROSCOPIA ELECTRÓNICA DE BARRIDO.....	91
15. ANÁLISIS DE PROTEÍNAS MEDIANTE ELECTROFORESIS EN GEL DE POLIACRILAMIDA CON SDS (SDS-PAGE) Y <i>WESTERN BLOT</i>	92
16. INFECCIÓN INTRANASAL DE RATONES CD1.....	93
17. ANÁLISIS ESTADÍSTICO.....	94
RESULTADOS.....	96

CAPÍTULO 1: ANÁLISIS DE LA CONTRIBUCIÓN RELATIVA DE LAS MODIFICACIONES DE LA MOLÉCULA DE LIPOOLIGOSACÁRIDO A FENOTIPOS ASOCIADOS A LA PATOGENESIS DE HiNT.....97

1.1. Respuestas del hospedador a la infección por aislados clínicos de HiNT de pacientes respiratorios crónicos.....97

1.1.1. Resistencia de aislados clínicos de HiNT al ataque bactericida de péptidos antimicrobianos.....98

1.1.2. Interacción de aislados clínicos de HiNT con el epitelio respiratorio humano.....102

1.1.3. Formación de biopelículas de aislados clínicos de HiNT sobre superficies abióticas.....104

1.2. Análisis de la contribución relativa de las sustituciones del LOS de HiNT a fenotipos asociados a patogénesis mediante la caracterización de cepas mutantes.....106

1.2.1. Contribución relativa de sustituciones del LOS a la resistencia de HiNT al ataque bactericida de péptidos antimicrobianos.....107

1.2.2. Contribución relativa de sustituciones del LOS de HiNT a la formación de biopelículas sobre superficies abióticas.....109

CAPÍTULO 2: DISECCIÓN DE LOS MECANISMOS DE SUBVERSIÓN CELULAR Y DE LA CONTRIBUCIÓN RELATIVA DE ADHESINAS BACTERIANAS DURANTE LA INFECCIÓN POR EL PATÓGENO RESPIRATORIO HiNT.....112

2.1. Contribución de las balsas lipídicas, integrinas, quinasas, GTPasas, señalización dependiente de PI3K-Akt y [AMPc] a la infección del epitelio respiratorio humano por HiNT.....112

2.1.1. Observación de la adhesión e invasión epitelial por HiNT mediante microscopía electrónica de barrido.....112

2.1.2. Papel de balsas lipídicas, caveolina y clatrina en la invasión del epitelio respiratorio humano por HiNT.....113

2.1.3. La actividad Akt es importante en la invasión del epitelio respiratorio humano por HiNT.....119

2.1.4. Las integrinas $\beta 1$ y $\alpha 5$ están implicadas en la invasión del epitelio respiratorio humano por HiNT.....123

2.1.5. Las tirosina quinasas están implicadas en la invasión del epitelio respiratorio por HiNT.....124

2.1.6. Contribución de GTPasas de la familia Rho en la invasión epitelial por HiNT.....129

2.1.7. Los niveles de AMP cíclico eucariota modulan la invasión de HiNT en el epitelio respiratorio.....	135
2.1.8. La fosforilación de Akt en células A549 infectadas por HiNT depende de Src y Rac1.....	136
2.1.9. Papel de RhoA en la invasión del epitelio respiratorio por HiNT375.....	136
2.2. Análisis de la contribución relativa de las adhesinas PCho, P5 y Hap, a la infección por HiNT.....	138
2.2.1. Análisis de la variabilidad entre aislados clínicos en la dinámica de la interacción entre HiNT y el epitelio pulmonar humano.....	138
2.2.2 Análisis de la contribución de las adhesinas PCho P5 y Hap de HiNT a fenotipos asociados a patogénesis mediante la caracterización de cepas mutantes.....	141
2.2.2.1. Contribución relativa de adhesinas de HiNT en estadios iniciales de la infección.....	142
2.2.2.2. Contribución relativa de adhesinas de HiNT en la infección <i>in vivo</i> mediante el empleo de un modelo de infección intranasal murina.....	146
DISCUSIÓN.....	150
1. RESPUESTAS DEL HOSPEDADOR A LA INFECCIÓN POR LOS AISLADOS RESPIRATORIOS CRÓNICOS DE HiNT Y POR MUTANTES TRUNCADOS EN EL LIPOOLIGOSACÁRIDO.....	154
2. MECANISMOS MOLECULARES IMPLICADOS EN LA INVASIÓN EPITELIAL POR HiNT.....	157
3. PAPEL DE P5, PCho Y HAP EN LA INFECCIÓN POR HiNT.....	165
CONCLUSIONES.....	168
REFERENCIAS.....	172
ANEXOS.....	198
ANEXO I: CEPAS, CEBADORES, PLÁSMIDOS, INHIBIDORES FARMACOLÓGICOS dsRNA Y ANTICUERPOS EMPLEADOS EN ESTE TRABAJO.....	199
ANEXO II: PUBLICACIONES.....	209

ÍNDICE DE FIGURAS

Figura 1: Representación esquemática de la interacción matriz extracelular-integrinas-contactos focales.

Figura 2: Representación esquemática de la composición bioquímica de las caveolas.

Figura 3: Regulación de la actividad de GTPasas.

Figura 4: Las GTPasas de la familia Rho regulan la organización de los filamentos de actina.

Figura 5: Regulación del citoesqueleto de microtúbulos por GTPasas de la familia Rho.

Figura 6: Reacciones metabólicas asociadas a la generación de las siete especies de PtdIns.

Figura 7: Representación esquemática del tracto respiratorio humano.

Figura 8: Estructura de la molécula de LOS de *H. influenzae*.

Figura 9: Estructura de la molécula de LOS de la cepa HiNT375.

Figura 10: Formación de una biopelícula bacteriana.

Figura 11: El modelo de infección del epitelio respiratorio humano por HiNT.

Figura 12: Generación de estirpes mutantes de HiNT.

Figura 13: Procesamiento de células en cultivo infectadas con HiNT en experimentos de adhesión.

Figura 14: Procesamiento de células en cultivo infectadas con HiNT en experimentos de invasión.

Figura 15: La exposición a los inhibidores químicos no modificó la viabilidad bacteriana.

Figura 16: Cepas isogénicas de HiNT aisladas de un mismo paciente respiratorio crónico en visitas médicas independientes presentan resistencia creciente a polimixina B y β -defensina I.

Figura 17: Adhesión de aislados clínicos de HiNT a células A549.

Figura 18: Contribución relativa de sustituciones oligosacáridicas del LOS de HiNT a la formación de biopelículas.

Figura 19: Imagen de microscopía electrónica de barrido mostrando la adhesión de HiNT375 a células del epitelio respiratorio humano A549.

Figura 20: Papel de las balsas lipídicas en la invasión de células A549 por HiNT375.

Figura 21: HiNT375 colocaliza con el gangliósido GM1.

Figura 22: Papel de la caveolina-1, dinamina y clatrina en la invasión epitelial por HiNT375.

Figura 23: Papel de la caveolina-1, dinamina y clatrina en la adhesión de células A549 por HiNT375.

Figura 24: Papel de Akt y PLC- γ en la invasión de células A549 por HiNT375.

Figura 25: Papel de las integrinas en la invasión epitelial de HiNT375.

Figura 26: Papel de las integrinas en la adhesión de HiNT375 al epitelio respiratorio.

Figura 27: Las tirosina quinasas de la célula hospedadora están implicadas en la invasión de HiNT375.

Figura 28: Las quinasas de la familia Src, incluyendo c-Src, están implicadas en la invasión epitelial por HiNT375.

Figura 29: GTPasas de la familia Rho actúan de forma coordinada en la invasión epitelial por HiNT375.

Figura 30: GTPasas de la familia Rho no modulan la adhesión epitelial de HiNT375.

Figura 31: El incremento de [AMPc] citosólico reduce la invasión del epitelio respiratorio por HiNT375.

Figura 32: Las tirosinas quinasas de la familia Src y Rac1 modulan la activación de Akt durante la infección por HiNT375.

Figura 33: RhoA y ROCK previenen la internalización epitelial de HiNT375.

Figura 34: Papel de la integrina $\alpha 5$ y de glicosilaciones eucariotas en la adhesión epitelial de aislados clínicos de HiNT.

Figura 35: Análisis comparativo de la adhesión e invasión de HiNT375, HiNT375 $\Delta lic1BC$, HiNT375 $\Delta ompP5$, HiNT375 Δhap , HiNT375 $\Delta hap\Delta ompP5$ y HiNT375 $\Delta hap\Delta lic1BC$ a células A549.

Figura 36: Papel de la integrina $\alpha 5$ y de glicosilaciones eucariotas en la adhesión epitelial de HiNT375.

Figura 37: Análisis comparativo de la infección por HiNT375, HiNT375 $\Delta lic1BC$, HiNT375 $\Delta ompP5$, HiNT375 Δhap , HiNT375 $\Delta hap\Delta ompP5$ y HiNT375 $\Delta hap\Delta lic1BC$ mediante un modelo de infección intranasal murino.

Figura 38: Modelo propuesto para explicar los mecanismos moleculares implicados en la internalización de HiNT375.

Figura 39: Papel de la integrina $\alpha 5$ en la adhesión epitelial de HiNT375, HiNT86-028NP y Hi Rd KW20.

Figura 40: Modulación de la [AMPc] en una célula eucariota.

ÍNDICE DE TABLAS

Tabla 1: Caracterización bioquímica de *H. influenzae*.

Tabla 2: Patogénesis de *H. influenzae* tipo b y de HiNT.

Tabla 3: Genes que codifican proteínas implicadas en la biosíntesis de LOS de HiNT.

Tabla 4: Adhesinas de *H. influenzae*.

Tabla 5: Preparación del medio M-IV.

Tabla 6. Características de las cepas clínicas de HiNT seleccionadas en este trabajo.

Tabla 7: Resistencia de los aislados clínicos de HiNT seleccionados a polimixina B.

Tabla 8: Resistencia de los aislados clínicos de HiNT seleccionados a polimixina B y β -defensina 1.

Tabla 9: Secuencia de los *loops* extracelulares predichos en la proteína P5 de los aislados de HiNT seleccionados.

Tabla 10: Formación de biopelículas de los aislados clínicos seleccionados.

Tabla 11: Características de los mutantes en genes que codifican enzimas responsables de la síntesis de LOS de HiNT empleadas en este trabajo.

Tabla 12: Resistencia a polimixina B de cepas mutantes generadas a partir de HiNT375 en las que la molécula LOS está truncada a distintos niveles.

Tabla 13: Resistencia a β -defensina 1 de cepas mutantes generadas a partir de HiNT375 en las que la molécula LOS está truncada a distintos niveles.

Tabla 14: Formación de biopelículas de cepas mutantes generadas a partir de HiNT375 en las que la molécula LOS está truncada a distintos niveles.

Tabla 15: Origen clínico de los aislados de HiNT usados en este estudio.

Tabla 16: Distribución génica (*lic1ABCD*, *ompP5*, *hap* y *hmw*) y expresión de PCho en las cepas seleccionadas en este trabajo.

Tabla 17: Análisis comparativo de la agregación de las cepas HiNT375, HiNT375 Δ *lic1BC*, HiNT375 Δ *ompP5*, HiNT375 Δ *hap*, HiNT375 Δ *hap* Δ *ompP5* y HiNT375 Δ *hap* Δ *lic1BC*.

Tabla 1, ANEXO I: Cepas utilizadas en este trabajo.

Tabla 2, ANEXO I: Cebadores utilizados en este trabajo.

Tabla 3, ANEXO I: Plásmidos usados en este trabajo.

Tabla 4, ANEXO I: Descripción de agentes farmacológicos utilizados en este trabajo.

Tabla 5, ANEXO I: dsRNA empleados en este trabajo.

Tabla 6, ANEXO I: Descripción de los anticuerpos utilizados en este trabajo.

Tabla 7, ANEXO I: Características de la colección de 20 sets de cepas de HiNT aisladas de 20 pacientes respiratorios crónicos (1 set por paciente) durante diferentes

visitas médicas como consecuencia de una agudización de la enfermedad crónica subyacente.

Tabla 8, ANEXO I: Origen clínico de la colección de cepas utilizadas en el estudio realizado por Marti-LLiteras *et al.* (2011).

ABREVIATURAS

ADN	Ácido desoxirribonucleico
Agua d.o.i.	Agua desionizada y purificada por ósmosis inversa
Ap	Ampicilina
AMPc	Adenosín monofosfato cíclico
ARN	Ácido ribonucleico
Arp2/3	del inglés <i><u>a</u>ctin <u>r</u>elated <u>p</u>rotein <u>2/3</u></i>
ATP	Adenosín trifosfato
BHI	Infusión de caldo de cerebro y corazón (del inglés <i><u>B</u>rain <u>H</u>ear</i> <i><u>t</u> Infusion)</i>
BCIP	5-bromo-4-cloro-3-indolfosfato
β-NAD	β-nicotinamida adenín dinucleótido
°C	Grado Celsius
Cdc42	del inglés <i><u>C</u>ell <u>d</u>ivision <u>c</u>ontrol <u>p</u>rotein <u>42</u> homolog</i>
CEACAM	del inglés <i><u>C</u>arcino<u>e</u>mbryonic <u>A</u>ntigen <u>C</u>ell <u>A</u>dhesion <u>M</u>olecule</i>
Cm	Cloranfenicol
CMP	Citidin monofosfato
COMTs	Centro organizador de los microtúbulos
CR1	del inglés <i><u>C</u>omplement <u>R</u>eceptor <u>1</u></i>
CRP	Proteína C-reactiva (del inglés <i><u>C</u>-<u>r</u>eactive <u>p</u>rotein</i>)
Crp	del inglés <i><u>c</u>AMP <u>r</u>eceptor <u>p</u>rotein</i>
CTAB	Hexadecil trimetil bromuro de amonio
Da	Dalton
DAF	del inglés <i><u>D</u>ecay <u>A</u>ccelerating <u>F</u>actor</i>
DAG	Diacilglicerol
DMSO	Dimetil sulfóxido
dNTP	Dinucleótido trifosfato
DO_{600nm}	Densidad óptica como absorbancia a λ=600 nm
DTT	Ditiotreitol
EDTA	Ácido etilen-diamino-tetracético
EEA1	del inglés <i><u>E</u>arly <u>E</u>ndosome <u>A</u>ntigen <u>1</u></i>
EGFR	del inglés <i><u>E</u>pidermal <u>G</u>rowth <u>F</u>actor <u>R</u>eceptor</i>
EPOC	Enfermedad pulmonar obstructiva crónica
ERK2	del inglés <i><u>E</u>xtracellular <u>s</u>ignal-<u>R</u>egulated <u>K</u>inase <u>2</u></i>
Erm	Eritromicina
FAK	del inglés <i><u>F</u>ocal <u>A</u>dhesion <u>K</u>inase</i>

FCV	Vacuola que contiene <i>Francisella</i> (del inglés <i><u>F</u>racisella-<u>C</u>ontaining <u>V</u>acuole</i>)
GFP	del inglés <i><u>G</u>reen <u>F</u>luorescent <u>P</u>rotein</i>
Gal	Galactosa
GalNAc	N-acetilgalactosamina
GAP	del inglés <i><u>G</u>TPase <u>A</u>ctivating <u>P</u>rotein</i>
GDI	del inglés <i><u>G</u>uanine nucleotide <u>D</u>issociation <u>I</u>nhibitor</i>
GDP	del inglés <i><u>G</u>uanine <u>D</u>iphosphate</i>
GEF	del inglés <i><u>G</u>uanine nucleotide <u>E</u>xchange <u>F</u>actor</i>
Glc	Glucosa
GlcN	Glucosamina
GPI	Glicosilfosfatidilinositol (del inglés <i><u>g</u>lycosyl<u>p</u>hosphatidyl<u>i</u>nositol</i>)
GTP	del inglés <i><u>G</u>uanine <u>T</u>riphosphate</i>
GTPasa	del inglés <i><u>G</u>uanine <u>T</u>riphosphatase</i>
h	Horas
HEPES	Ácido N-2-Hidroxietilpiperazina-N'-2'-Etanolsulfónico
Hep	Heptosa
HGT	del inglés <i><u>H</u>orizontal <u>G</u>ene <u>T</u>ransfer</i>
HiNT	<i><u>H</u>aemophilus <u>i</u>nfluenzae no tipable</i>
HMW	del inglés <i><u>H</u>igh <u>M</u>olecular <u>W</u>eight</i>
HRP	del inglés <i><u>H</u>orse<u>r</u>adish <u>p</u>eroxidase</i>
ICAM-1	del inglés <i><u>I</u>nter<u>c</u>ellular <u>A</u>dhesion <u>M</u>olecule-1</i>
IgA	Inmunoglobulina A
IL	Interleuquina
kb	Kilobase
Kdo	Ácido 2-ceto-3-deoxi-D-mano-octulosónico
Km	Kanamicina
Lamp	del inglés <i><u>l</u>ysosomal <u>a</u>ssociated <u>m</u>arker <u>p</u>rotein</i>
LB	Luria Bertani
LBP	del inglés <i><u>l</u>ipopolysaccharide <u>b</u>inding <u>p</u>rotein</i>
LIMK	del inglés <i><u>L</u>IM <u>k</u>inase</i>
LOS	Lipooligosacárido
LPS	Lipopolisacárido
LTM	del inglés <i><u>L</u>iquid <u>T</u>esting <u>M</u>edium</i>
M6PR	del inglés <i><u>M</u>annose 6-<u>P</u>hosphate <u>R</u>eceptor</i>
MAP	del inglés <i><u>M</u>itogen-<u>A</u>ssociated <u>P</u>rotein</i>
MβCD	Metil-β-ciclodextrina

MBP	del inglés <i><u>M</u>annose <u>B</u>inding <u>P</u>rotein</i>
MCP	del inglés <i><u>M</u>embrane <u>C</u>ofactor <u>P</u>rotein</i>
mDia	del inglés <i><u>m</u>ammalian <u>d</u>iaphanous</i>
MHC	Complejo mayor de histocompatibilidad (del inglés <i><u>M</u>ajor <u>H</u>istocompatibility <u>C</u>omplex</i>)
Min	Minutos
μl	Microlitro
ml	Mililitro
MLC	del inglés <i><u>M</u>yosin <u>L</u>ight <u>C</u>hain</i>
μM	Micromolar
mM	Milimolar
MMR	del inglés <i><u>M</u>ethyl-directed <u>M</u>ismatch <u>R</u>epair</i>
NBT	Nitroazul de tetrazolio
Neu5Ac	Ácido N-acetilneuramínico o ácido siálico
NETs	del inglés <i><u>N</u>eutrophil <u>E</u>xtracellular <u>T</u>raps</i>
NLR	del inglés <i><u>N</u>od <u>L</u>ike <u>R</u>eceptors</i>
NPFs	del inglés <i><u>N</u>ucleation <u>P</u>romoting <u>F</u>actors</i>
NTHi-CV	Vacuola que contiene HiNT (del inglés <i><u>N</u>THi-<u>c</u>ontaining <u>v</u>acuole</i>)
OAc	Grupo O-acetilo
P	Grupo fosfato
PAI	del inglés <i><u>P</u>athogenicity <u>I</u>sland</i>
PAs	Péptidos antimicrobianos
PAF	Factor activador de plaquetas (del inglés <i><u>P</u>latelet <u>A</u>ctivating <u>F</u>actor</i>)
PAF-R	Receptor de PAF
PAK	del inglés <i><u>p</u>21 <u>a</u>ctivated <u>k</u>inase</i>
PAMP	Patrón molecular asociado a patógeno (del inglés <i><u>P</u>athogen-<u>A</u>ssociated <u>M</u>olecular <u>P</u>attern</i>)
PE	Proteína E
pb	Par de bases
PBS	Solución amortiguadora de fosfato salino
PCho	Fosforilcolina
PCR	Reacción en cadena de la polimerasa (del inglés <i><u>P</u>olymerase <u>C</u>hain <u>R</u>eaction</i>)
PDE	Fosfodiesterasa (del inglés <i><u>p</u>hosphod<u>i</u>esterase</i>)
PEtn	Fosfoetanolamina
PFA	Paraformaldehído

PFGE	del inglés <u>P</u> ulse <u>F</u> ield <u>G</u> el <u>E</u> lectrophoresis
PGE₂	Prostaglandina E ₂
PI3K	del inglés <u>P</u> hosphatidy <u>l</u> inositol 3- <u>K</u> inase
PtdIns(4,5)₂	Fostatidilinositol 4,5 bifosfato
PtdIns(3,4,5)₃	Fostatidilinositol 3,4,5 trifosfato
PKA	Proteína quinasa A (del inglés <u>P</u> rotein <u>K</u> inase <u>A</u>)
PKC	Proteína quinasa C (del inglés <u>P</u> rotein <u>K</u> inase <u>C</u>)
PLC-γ	Fosfolipasa C-γ (del inglés <u>P</u> hospholipase <u>C</u> -γ)
PMN	Polimorfonucleares
PRR	del inglés <u>P</u> attern <u>R</u> ecognition <u>R</u> eceptors
Rac	del inglés <u>R</u> as-related <u>C</u> 3 botulinum toxin substrate
RhoA	del inglés <u>R</u> as <u>h</u> omolog gene family, member <u>A</u>
RE	Retículo endoplásmico
ROCK	del inglés <u>R</u> ho-associated <u>k</u> inase
ROS	del inglés <u>R</u> eactive <u>O</u> xygen <u>S</u> pecies
r.p.m.	Revoluciones por minuto
s	Segundos
SAAT	del inglés <u>S</u> elf- <u>A</u> ssociating <u>A</u> uto <u>t</u> ransporters
SAP	del inglés <u>S</u> ensitivity to <u>A</u> ntimicrobial <u>P</u> eptides
SBF	Suero bovino fetal
sBHI	Infusión de caldo de cerebro y corazón suplementada
SDS	Dodecilsulfato sódico
SDS-PAGE	Electroforesis en gel de poliacrilamida con SDS
SH2	del inglés <u>S</u> rc <u>H</u> omology <u>2</u>
SIC	del inglés <u>S</u> treptococcal <u>I</u> nhibitor of <u>C</u> omplement
SS	<u>S</u> istema de <u>s</u> ecreción
SSR	repeticiones de secuencia simple (del inglés <u>S</u> imple <u>S</u> equences <u>R</u> epeats)
TA	<u>T</u> emperatura <u>a</u> mbiente
TE	Tampón <u>T</u> ris- <u>E</u> DTA
TGF	del inglés <u>T</u> ransforming <u>G</u> rowth <u>F</u> actor
TLR	del inglés <u>T</u> oll <u>L</u> ike <u>R</u> eceptors
TNFα	del inglés <u>T</u> umor <u>N</u> ecrosis <u>F</u> actor <u>α</u>
Tris	Tris (hidroximetil) aminometano
TSB	del inglés <u>T</u> rypticase <u>S</u> oy <u>B</u> roth
u.f.c.	<u>U</u> nidades <u>f</u> ormadoras de <u>c</u> olonias
USS	Señal específica de captura (del inglés <u>U</u> ptake <u>S</u> pecific <u>S</u> ignal)

vATPasa

ATPasa vacuolar

RESUMEN

Haemophilus influenzae no tipable (HiNT) es una bacteria Gram negativa integrante de la microbiota normal humana, y un patógeno oportunista que causa infecciones no respiratorias y respiratorias agudas, e infecciones crónicas que favorecen la progresión de enfermedades respiratorias crónicas asociadas al tabaquismo.

En esta Tesis Doctoral, hemos caracterizado el papel de un conjunto de estructuras de la superficie de HiNT como factores de virulencia implicados a distintos niveles del proceso infeccioso, mediante el empleo de mutantes generados en el laboratorio y de aislados clínicos. Hemos analizado la heterogeneidad fenotípica de aislados clínicos de HiNT respecto a su resistencia al ataque bactericida de péptidos antimicrobianos, a su interacción con superficies abióticas y epiteliales, y a mecanismos moleculares de subversión del epitelio respiratorio empleados por el patógeno durante los procesos de adhesión e invasión epitelial. Asimismo, el análisis de este repertorio de fenotipos asociados a virulencia en una batería de cepas mutantes que carecen de estructuras superficiales del patógeno, incluyendo modificaciones del lipopolisacárido y adhesinas de naturaleza proteica, nos ha permitido establecer una asociación directa entre moléculas bacterianas y elementos de la inmunidad innata del hospedador.

Por otra parte, hemos diseccionado la implicación de un conjunto de moléculas eucariotas en la invasión del epitelio respiratorio humano por HiNT, mediante la infección de células epiteliales humanas en cultivo en combinación con la interferencia de moléculas eucariotas *ad hoc*. Mediante esta disección, presentamos un modelo que integra un conjunto de eventos moleculares, incluyendo receptores y elementos de cascadas de señalización eucariota con un papel esencial en la invasión epitelial por este patógeno respiratorio.

En conjunto, la identificación de moléculas, tanto bacterianas como celulares, implicadas en la infección por HiNT nos ha permitido ampliar nuestro conocimiento sobre la patogénesis de HiNT, así como la identificación de potenciales dianas terapéuticas para combatir la infección por este patógeno respiratorio.

ABSTRACT

The Gram negative bacterium nontypable *Haemophilus influenzae* (NTHi) is a commensal organism in the human upper respiratory tract, and an opportunistic pathogen that causes acute and chronic respiratory infections, and favors the progression of the chronic respiratory diseases linked to tobacco smoking.

During this PhD thesis work, we have characterized the role of a collection of NTHi surface structures as virulence factors involved in the infectious process, by employing mutant strains generated in the laboratory and clinical isolates. We have analyzed NTHi clinical isolates phenotypic heterogeneity regarding their resistance to antimicrobial peptides, bacterial interaction with both inert and host epithelial cell surfaces, and the molecular mechanisms employed to subvert the host respiratory epithelium during the events of epithelial adhesion and invasion. Likewise, we have analyzed the same virulence-related phenotypes in a collection of mutant strains lacking surface structures, such as the lipopolysaccharide and adhesive proteins. Altogether, this part of the work has allowed us to establish an association between bacterial molecules and host innate immunity elements.

Moreover, we have analyzed in detail the implication of a set of eukaryotic molecules in human respiratory epithelial invasion by NTHi, by infection of cultured human epithelial cells, and in combination with the interference of eukaryotic molecules *ad hoc*. Through this dissection, we present a model that integrates a number of molecular events, including receptor molecules and elements of several eukaryotic signaling pathways with an essential role in NTHi epithelial invasion.

Overall, the identification of molecules, both of bacterial as cellular origin involved in the NTHi infection, has allowed us to expand our knowledge on NTHi pathogenesis, and the identification of potential therapeutic targets to fight the infection by this bacterial respiratory pathogen.

INTRODUCCIÓN

1. BASES DE LA PATOGÉNESIS BACTERIANA

El cuerpo humano es un nicho en el que existe una variedad de comunidades microbianas que desempeñan funciones fundamentales en la salud y enfermedad. El microbioma es el conjunto de microorganismos, sus elementos genéticos (genomas) y sus interacciones en un nicho concreto. La microbiota normal humana es el conjunto de microorganismos que reside de manera habitual en distintos sitios del cuerpo humano, incluyendo la piel y mucosas respiratoria, conjuntiva, gastrointestinal y urogenital; está constituida por microorganismos comensales y por patógenos oportunistas (Wilson *et al.*, 2011). Los patógenos oportunistas son microorganismos que habitualmente no causan una infección sintomática/enfermedad en individuos sanos, pero sí en individuos cuya inmunidad se encuentra comprometida por distintas razones, incluyendo edad, genética, exposición continua a agentes ambientales, co-infecciones, u otros. Por el contrario, los patógenos profesionales son microorganismos cuya infección es sintomática y cursa como enfermedad infecciosa en individuos tanto sanos como comprometidos desde el punto de vista inmunológico. En cualquier caso, un rasgo común a todos los microorganismos patógenos es la subversión de la inmunidad del hospedador en beneficio propio, es decir, los patógenos han desarrollado estrategias sofisticadas de manipulación de moléculas y cascadas de señalización eucariota con funciones fisiológicas diversas en el individuo hospedador, lo que provoca una infección que en último término permite y favorece la supervivencia del patógeno (Wilson *et al.*, 2011).

La suma de características estructurales, bioquímicas y genéticas contribuye a la patogenicidad de cada microorganismo. Cada microorganismo patógeno está provisto de un repertorio de factores de colonización y/o virulencia a través de los cuales provoca una infección que resulta beneficiosa para el propio patógeno. La infección tiene consecuencias diversas para el hospedador, que van desde una colonización asintomática en el caso de la infección de individuos sanos por patógenos oportunistas hasta una infección con desenlace fatal (Wilson *et al.*, 2011). La exclusividad de cada especie patógena hace pertinente el estudio de los factores y mecanismos de virulencia a través de los cuales cada patógeno subvierte o manipula la inmunidad del hospedador en beneficio propio, así como de las características y consecuencias de la interacción hospedador-patógeno. La determinación precisa de elementos implicados en dicha interacción resulta clave en la identificación de posibles dianas terapéuticas que pueden ser explotadas para combatir una determinada infección.

Existe un conjunto de etapas comunes a un amplio número de infecciones bacterianas, si bien cada infección particular presenta a su vez rasgos específicos. De esta forma, los patógenos (i) interaccionan/se adhieren a superficies del hospedador para su colonización; (ii) evaden las barreras defensivas del hospedador para su infección; (iii) captan nutrientes esenciales para poder proliferar; (iv) se diseminan en el individuo y/o entre individuos, un aspecto crítico para la supervivencia del patógeno; (v) provocan una infección sintomática. El desarrollo de sintomatología no es un requerimiento para la supervivencia del patógeno, sino el resultado de la mera presencia del microorganismo o de la respuesta del hospedador a dicha presencia (Wilson *et al.*, 2011).

La piel y las mucosas son nichos permanentemente colonizados por la microbiota normal. Al mismo tiempo, son tanto una primera barrera defensiva como una puerta de entrada para patógenos. La colonización epitelial de las mucosas es con frecuencia un primer paso en el desarrollo de una infección. Los patógenos presentan moléculas con capacidad adhesiva a través de las cuales interaccionan de forma específica con superficies celulares. La adhesión facilita la interacción del patógeno con el hospedador y, al mismo tiempo, evita su arrastre y/o eliminación por elementos presentes en las mucosas como es el moco. Las principales estrategias de adhesión bacteriana se basan en el empleo de pili o fimbrias y de adhesinas de tipo no-fimbria, a través de las cuales las bacterias se adhieren a superficies celulares directamente, o indirectamente a través de la unión a proteínas de la matriz extracelular. La adhesión a superficies celulares determina cambios conformacionales que desencadenan a su vez cascadas de señalización en la célula hospedadora (Wilson *et al.*, 2011). En este contexto, los microorganismos pueden residir extracelularmente (patógenos extracelulares), y cursar la infección a través de la unión íntima a superficies celulares (p.e. *Escherichia coli* enteropatogénica) (Wong *et al.*, 2012), a través de la formación de comunidades microbianas organizadas conocidas como biopelículas o *biofilms* (*Pseudomonas aeruginosa*) (Brugha & Davies, 2011), o mediante el desplazamiento a través de fluidos o superficies corporales (*Vibrio parahaemolyticus*) (McCarter & Silverman, 1990). Por otra parte, existen patógenos intracelulares facultativos, con capacidad para invadir células no fagocíticas o fagocitos profesionales, cuyo interior puede ser empleado como nicho donde alojarse (p.e. *Escherichia coli* uropatogénica) (Agarwal *et al.*, 2012) o como nicho replicativo (*Legionella pneumoniae*) (Tilney *et al.*, 2001). Por último, existen patógenos intracelulares obligados, capaces de residir únicamente dentro de células del hospedador (*Chlamydia* spp.) (Vivoda *et al.*, 2011).

Los patógenos han desarrollado diversas estrategias de evasión de la inmunidad del hospedador.

(i) Evasión del sistema de complemento y de la fagocitosis por fagocitos profesionales. Algunos patógenos presentan una cápsula polisacáridica que previene la activación del complemento y la ingestión por fagocitos profesionales (Hallstrom & Riesbeck, 2010). Asimismo, algunos patógenos presentan cápsulas que mimetizan estructuras eucariotas, como es el caso de *Streptococcus pyogenes*, que presenta una cápsula con ácido hialurónico (Cole *et al.*, 2010). Igualmente, la composición y longitud del antígeno O del lipopolisacárido (LPS) de patógenos Gram negativos previene la activación del sistema de complemento (Clay *et al.*, 2008). Respecto a la evasión de fagocitos profesionales, existen enzimas bacterianas que degradan el quimioatrayente C5a (Oda *et al.*, 1990), y toxinas que previenen la activación, inhiben la migración, reducen el daño oxidativo o provocan la muerte de fagocitos profesionales (Cheung *et al.*, 2010).

(ii) Localización intracelular. Como se ha mencionado previamente, existen patógenos intracelulares facultativos, que han desarrollado la capacidad de invadir células a través de la adhesión a las mismas y estimulación de cambios del citoesqueleto celular que facilitan la internalización bacteriana. Habitualmente, las bacterias internalizadas se alojan en compartimentos subcelulares que maduran con lisosomas y son eliminadas. Los patógenos intracelulares han desarrollado estrategias para sobrevivir intracelularmente, que incluyen la neutralización de componentes del fagolisosoma (mediante estructuras bacterianas superficiales refractarias a la acción de proteasas lisosomales) (Omsland & Heinzen, 2011), la resistencia a especies reactivas de oxígeno y nitrógeno (mediante las actividades catalasa y superóxido dismutasa) (Hebrard *et al.*, 2009), la prevención de la fusión fagolisosomal (*Legionella*, *Salmonella*, *Mycobacterium*) (Knodler & Steele-Mortimer, 2003; Philips, 2008; Tilney *et al.*, 2001), o el escape del fagosoma (*Listeria*) (Pizarro-Cerda & Cossart, 2006).

(iii) Evasión de la respuesta inmune mediada por anticuerpos. La variación antigénica de estructuras superficiales, el mimetismo molecular, la unión a proteínas del hospedador como lactoferrina, transferrina, fibronectina, o la porción Fc de los anticuerpos, son estrategias empleadas por diversos patógenos para evadir la respuesta inmune mediada por anticuerpos (Fanning *et al.*, 2012; Guner, 1996; Smith *et al.*, 2011).

Un aspecto esencial para la supervivencia del patógeno es su propagación. La subversión del citoesqueleto celular de actina para la propulsión intracelular y diseminación de célula a célula es empleada por *Listeria*, *Shigella* y *Rickettsia* (Stevens *et al.*, 2006). Otros patógenos emplean células del hospedador como nicho replicativo, provocando la muerte celular y liberación de la progenie al espacio

extracelular en el que, mediante ADNasas y proteasas bacterianas, se facilita la diseminación de dicha progenie y la progresión de la infección (Krishnan *et al.*, 2010).

Durante esta Tesis Doctoral, hemos profundizado en el estudio de la patogénesis de *Haemophilus influenzae* no tipable (HiNT), un miembro habitual de la microbiota respiratoria humana y patógeno oportunista.

1.1. Factores de virulencia bacteriana

Los factores de virulencia son moléculas expresadas y/o secretadas por microorganismos patógenos que participan en la colonización microbiana de un determinado nicho del individuo hospedador (incluyendo factores de adhesión, invasión, evasión y diseminación celular), en la adquisición de nutrientes, en la evasión de la inmunidad del hospedador, en la inmunosupresión o bloqueo de la respuesta defensiva del hospedador y en la propagación de la infección (Wilson *et al.*, 2011). Los factores de virulencia bacterianos más destacados son: (i) las adhesinas, de tipo fimbria o tipo no-fimbria; (ii) el lipopolisacárido (LPS), en el caso de bacterias Gram negativas; (iii) el flagelo, una estructura filamentosa formada principalmente por subunidades de flagelina, unida a la superficie bacteriana a través de un complejo proteico a modo de gancho, y que se extiende hacia el exterior desde la superficie bacteriana. Sirve para propulsar la célula bacteriana, facilitando su desplazamiento en medio líquido (*swimming*), a través de superficies (*swarming*) o a través de medios viscosos como el moco (Kirov, 2003); (iv) la cápsula bacteriana; (v) toxinas microbianas, moléculas producidas (endotoxinas) y/o secretadas (exotoxinas) por microorganismos patógenos que provocan daño en el individuo hospedador; (vi) moléculas secretadas a través de sistemas de secreción bacterianos. Se han descrito siete tipos de sistemas de secreción (SS) en bacterias (tipo I a tipo VII, SST1 and SST7). Entre ellos y a modo de ejemplo, el SST3 presenta una estructura reminiscente de la estructura flagelar. Es un sistema de secreción a modo de jeringa molecular presente en numerosos patógenos bacterianos Gram negativos (*Salmonella*, *Shigella*, *Pseudomonas*), a través del cual se produce la translocación de factores de virulencia (efectores) del citosol bacteriano a la célula eucariota, donde se dirigen a dianas específicas y manipulan de forma fina funciones fisiológicas de la célula hospedadora en beneficio del patógeno (Thanassi *et al.*, 2012).

1.2. Papel de la modificación y del intercambio de material genético en la virulencia bacteriana

La capacidad de una bacteria para responder a una presión selectiva, para sobrevivir a condiciones ambientales adversas, o para explotar nichos nuevos, depende de su capacidad de evolución a través de mutaciones en genes existentes o de la adquisición de material genético nuevo mediante transferencia génica horizontal (HGT, del inglés *horizontal gene transfer*). Las mutaciones espontáneas que provocan cambios puntuales, inserciones, deleciones, duplicaciones e inversiones génicas son eventos con frecuencias bajas. La variación de fase, la variación antigénica y la HGT son eventos con frecuencias altas. HGT es un fenómeno de intercambio de fragmentos de ADN que ocurre en un solo paso, entre bacterias de la misma y de distintas especies (Benedek & Schubert, 2007). HGT contribuye a generar una amplia diversidad genómica entre aislados, a la rápida evolución de bacterias patógenas, y se mantiene de forma estable en ausencia de presión selectiva. La evolución de numerosos factores de virulencia y resistencias antibióticas implica HGT. HGT tiene lugar mediante: (i) transformación natural de ADN procedente de una bacteria donadora, que es liberado al medio, captado por una bacteria receptora, e introducido en su propio genoma mediante recombinación homóloga; (ii) conjugación de plásmidos o transposones; (iii) transducción por bacteriófagos (Benedek & Schubert, 2007).

Las islas de patogenicidad (PAI, del inglés *pathogenicity islands*) son segmentos de ADN adquiridos mediante HGT que contienen uno o varios factores de virulencia. Los genes localizados en PAI codifican proteínas con funciones diversas, incluyendo pili, sistemas de captación de hierro, operones de síntesis de cápsula, modificaciones del LPS, sistemas de secreción o toxinas. La adquisición de una PAI mediante HGT puede convertir en un único paso una bacteria comensal en patógena (Valdez *et al.*, 2009).

En conjunto, existen múltiples mecanismos de intercambio de material genético en bacterias, lo que causa un elevado grado de diversidad genética dentro de una misma especie.

1.3. Moléculas del hospedador moduladas durante la infección bacteriana

A continuación, se presenta un conjunto de moléculas, estructuras y cascadas de señalización eucariota que son manipuladas durante la infección por distintos patógenos bacterianos.

1.3.1. Integrinas

Las integrinas son una familia de glicoproteínas heterodiméricas, formadas por dos subunidades, α y β , localizadas en la superficie de células eucariotas. Se han identificado 24 tipos de integrinas, como resultado de la combinación de las 18 subunidades α y las 8 subunidades β conocidas hasta la fecha. Las integrinas presentan un dominio extracelular, una región transmembrana y una cola citosólica (Arnaout *et al.*, 2005). Las células eucariotas están expuestas a señales externas que modulan la actividad celular para adaptarse a las condiciones ambientales. Las integrinas juegan un papel esencial como sensores de este tipo de señales y transmisores de las mismas al citosol celular. De esta manera, las integrinas interaccionan a través de su región extracelular con ligandos específicos, como son las proteínas de la matriz extracelular, lo que determina un cambio conformacional en sus colas citosólicas y, en último término, la activación de cascadas de señalización celular concretas (**Fig. 1**). Las integrinas están implicadas en una gran variedad de procesos biológicos: interacciones célula-célula, interacciones célula-matriz extracelular, migración, proliferación y supervivencia celular (Ridley, 2004).

Los patógenos bacterianos explotan la actividad de las integrinas durante la infección celular mediante al menos dos estrategias: (i) proteínas localizadas en la superficie bacteriana que se unen a integrinas de forma específica y directa (invasina de *Yersinia enterocolitica*, Ipa de *Shigella flexneri*, CagL de *Helicobacter pylori*) (Conradi *et al.*, 2012; Nagele *et al.*, 2011; Watarai *et al.*, 1996); (ii) proteínas localizadas en la superficie bacteriana que se unen a integrinas de forma indirecta, a través de su unión a proteínas de la matriz extracelular (Slanina *et al.*, 2010) (FnbpA y B de *Staphylococcus aureus*, F1/Sbfl de *Streptococcus pyogenes*, BadA de *Bartonella henselae* o Hlp/LBP de *Mycobacterium leprae*) (Byrd *et al.*, 1993; Caswell *et al.*, 2007; Fowler *et al.*, 2000; Riess *et al.*, 2004).

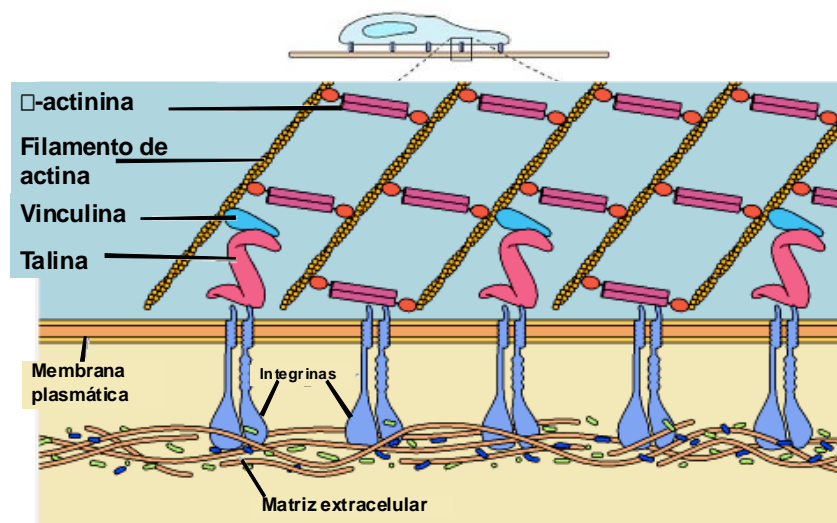


Figura 1. Representación esquemática de la interacción matriz extracelular-integrinas-contactos focales. Las integrinas conectan el citoesqueleto citosólico con la matriz extracelular. A través de su dominio extracelular, la integrina interacciona con componentes de la matriz extracelular como la fibronectina; a través de su cola citosólica, la integrina interacciona con quinasas, proteínas de citoesqueleto y elementos integrantes de cascadas de señalización celular (talina, vinculina, actinina y actina). Estas interacciones proteína: proteína que establecen una conexión inequívoca entre el medio extracelular y el citosol eucariota, ocurren en regiones denominadas contactos focales.

Los contactos focales son grupos dinámicos de proteínas estructurales y reguladoras que se organizan en cascadas de transducción de señales en dirección medio externo-citosol eucariota y viceversa (Zamir & Geiger, 2001). Las proteínas de unión a las integrinas paxilina y talina se unen a las colas citosólicas de las integrinas y contribuyen al reclutamiento de FAK (del inglés *focal adhesion kinase*) y vinculina a los contactos focales (Zamir & Geiger, 2001). La activación de integrinas por unión específica a ligando provoca un cambio conformacional que estimula la autofosforilación y consiguiente activación de FAK. Esta autofosforilación genera un sitio de unión de alta afinidad para proteínas con dominios SH2 (del inglés *Src homology 2*), entre las que se encuentran tirosina quinasas de la familia Src como c-Src. El complejo FAK-Src, una vez activado, recluta y activa factores de señalización y proteínas adaptadoras (p130Cas, calpaína, ERK2- del inglés *extracellular signal-regulated kinase 2*, etc.), que modulan una gran variedad de funciones de la célula hospedadora (Zamir & Geiger, 2001) (**Fig. 1**).

Existe un repertorio de patógenos bacterianos, incluyendo *Neisseria meningitidis*, *Staphylococcus aureus*, *Borrelia burgdorferi* y *Salmonella typhimurium*, que han desarrollado estrategias para la modulación de la señalización mediada por integrinas en los contactos focales en beneficio propio, especialmente para favorecer

su internalización en la célula hospedadora (Fowler *et al.*, 2003; Shi & Casanova, 2006; Slanina *et al.*, 2010; Wu *et al.*, 2011).

1.3.2. Carcinoembryonic antigen-related cell adhesion molecule (CEACAM)

La superfamilia de las inmunoglobulinas (Ig) contiene un repertorio de receptores que actúan como moléculas de adhesión celular (CAM, del inglés cell adhesion molecules) entre los que se encuentran la familia CEACAM (del inglés, carcinoembryonic antigen-related cell adhesion molecule). Los receptores CEACAM presentan un dominio extracelular, una región transmembrana y un dominio citosólico. La parte amino-terminal del dominio extracelular presenta una región variable de tipo inmunoglobulina. El resto del dominio extracelular está formado por un número variable de regiones constantes de tipo inmunoglobulina. El dominio extracelular está unido a la membrana a través de una región transmembrana o de una molécula de glicosilfosfatidilinositol (GPI, del inglés glycosyl-phosphatidylinositol) que actúa a modo de anclaje (Gray-Owen & Blumberg, 2006). Este grupo de receptores presenta 13 miembros: CEACAM 1, CEACAM 3-8, CEACAM 16, CEACAM 18-21 y PSG1-11. De forma fisiológica, los receptores CEACAM están implicados en la neogénesis vascular, metabolismo de la insulina, desarrollo de tumores y apoptosis (Gray-Owen & Blumberg, 2006). Existe un repertorio de patógenos bacterianos que presentan en su superficie ligandos a través de los cuales se unen de forma específica a moléculas CEACAM, empleando estas moléculas eucariotas a modo de receptores. Entre ellos, se encuentran *Neisseria meningitidis*, *Neisseria gonorrhoeae*, *Haemophilus influenzae* y *Moraxella catarrhalis*, que presentan adhesinas a través de las cuales interaccionan con CEACAM 1 (Hill *et al.*, 2001; Toleman *et al.*, 2001; Virji *et al.*, 1996).

1.3.3. Balsas lipídicas y rutas endocíticas

Las balsas lipídicas (en inglés, *lipid rafts*) son dominios de la membrana plasmática eucariota de 10-200 nm de diámetro enriquecidos en colesterol, esfingolípidos y las proteínas caveolinas (1, 2 y 3), flotilina, quinasas de la familia Src y proteínas de anclaje a GPI (en inglés *GPI anchored proteins*) (Echarri *et al.*, 2007). Las caveolas son un tipo de balsa lipídica (**Fig. 2**). Las caveolas son regiones en las que se producen eventos de endocitosis en los que intervienen caveolinas y la GTPasa dinamina. Durante el proceso de endocitosis, la región carboxi-terminal de las

caveolinas se orienta hacia el lumen de la vesícula endocítica y el dominio transmembrana queda integrado en la membrana plasmática a modo de horquilla (Anderson, 1998). La actividad de las caveolinas está condicionada por su fosforilación, catalizada por quinasas de la familia Src (del Pozo *et al.*, 2005). Existe un repertorio de patógenos bacterianos que han adoptado diferentes estrategias para explotar las balsas lipídicas y las caveolas durante el curso de la infección, para invadir células eucariotas. Entre ellos, se incluyen *Chlamydia trachomatis*, *Haemophilus influenzae*, *Campylobacter abortus* o *Brucella abortus* (Kim & Chung, 2002; Morey *et al.*, 2011; Wooldridge *et al.*, 1996). Por otro lado, la clatrina es otra proteína que recubre vesículas en el proceso de transporte entre membranas. La clatrina es una proteína formada por tres cadenas pesadas y tres cadenas ligeras dispuesta en forma de trisquelion (complejo de tres brazos). La clatrina favorece la invaginación de la vesícula, facilitando su desprendimiento de la membrana donde se origina. Cuando se produce la invaginación de la vesícula, la clatrina se desprende de la membrana con la ayuda de la GTPasa dinamina (Mettlen *et al.*, 2009).

Algunos patógenos bacterianos han desarrollado diferentes mecanismos para utilizar la endocitosis mediada por clatrina para invadir células del hospedador. Entre ellos, se incluyen *Listeria monocytogenes*, *Staphylococcus aureus* y *Haemophilus influenzae* biogrupo *aegyptius*. (Serruto *et al.*, 2009; Veiga & Cossart, 2005).

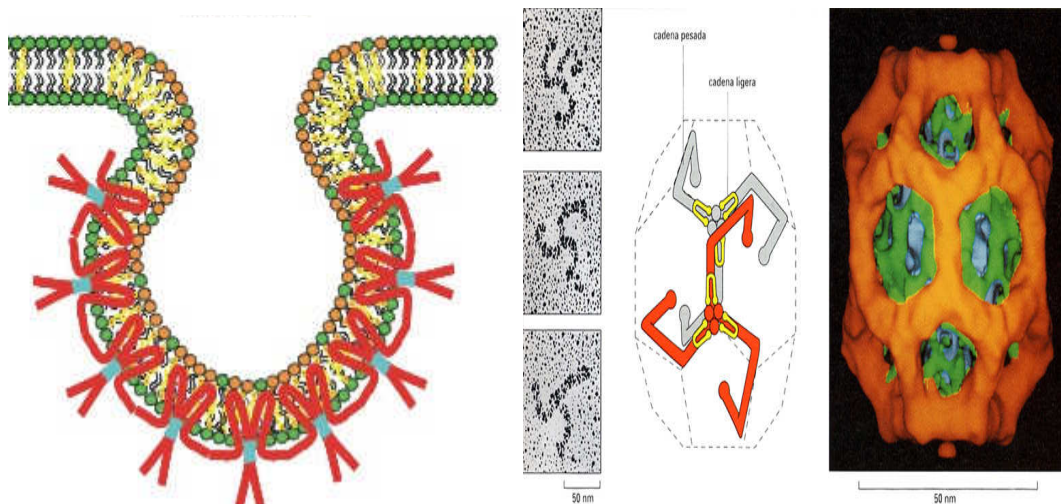


Figura 2. Representación esquemática de la composición bioquímica de las caveolas (imagen izquierda). Las caveolas son invaginaciones de las balsas lipídicas, dominios de la membrana plasmática enriquecidos en colesterol (amarillo), fosfolípidos (verde) y esfingolípidos (naranja). Una de las proteínas implicadas en la invaginación de las caveolas es la caveolina (rojo). Es una proteína estructural que reviste de forma abundante las caveolas. **Estructura de la clatrina.** Imagen de microscopía electrónica de transmisión en donde se observa la clatrina, formada por tres cadenas pesadas y tres cadenas ligeras en forma de trisquelion (complejo de tres brazos) (imagen derecha).

1.3.4. Citoesqueleto de la célula hospedadora

Las células eucariotas migran, se adhieren a superficies, organizan la disposición de sus orgánulos, transportan vesículas, etc. El citoesqueleto celular es un almacén molecular formado por microfilamentos de actina, microtúbulos y filamentos intermedios, responsable del mantenimiento formal, estructural y subestructural, migración y localización celular.

i) Citoesqueleto de actina

En la célula, la actina presenta dos conformaciones: actina G monomérica y actina F polimerizada en filamentos de actina. Los filamentos de actina son estructuras estables, sólidas, flexibles, polarizadas y ramificadas. A partir de dos monómeros de actina G se forma un dímero, y tras la unión de otro monómero se forma el trímero, que es una unidad estable a partir de la cual se forma un filamento mediante incorporaciones sucesivas de monómeros (Lehninger, 2007). La polimerización-despolimerización de actina está regulada por las proteínas asociadas a la actina. La profilina, tropomiosina, actinina α y fimbrina favorecen la polimerización de actina; la timosina, gelsolina y la villina regulan negativamente la polimerización de actina.

Las células modifican la disposición de membrana plasmática a través de la polimerización-despolimerización de microfilamentos de actina: (i) las fibras de estrés son haces de filamentos de actina y miosina que cruzan la célula; (ii) el córtex celular es una acumulación de filamentos de actina situados debajo de la membrana plasmática; (iii) los filopodios son estructuras tipo microvellosidad, si bien más alargadas, delgadas y dinámicas; (iv) las microespículas son estructuras semejantes a filopodios cortos; (v) los lamelipodios son estructuras en forma de lámina formadas por una red ortogonal de filamentos de actina entrecruzados; (vi) los pseudópodos son un tipo de prolongación con forma vesicular (Lehninger, 2007).

ii) Microtúbulos

Los microtúbulos son estructuras tubulares formadas por anillos, que intervienen en la forma y división celular y en el transporte de vesículas a través del citoplasma. Cada anillo está constituido por subunidades globulares; cada glóbulo es una molécula de tubulina. Hay dos tipos de tubulina, α y β , que forman heterodímeros; la tubulina α está asociada a una molécula de GTP y la tubulina β está asociada a una molécula de GTP o GDP. Los microtúbulos se organizan y su nucleación se inicia en los centros organizadores de los microtúbulos (COMTs: centriolos, cuerpos basales de

los cilios, cinetócoros de los cromosomas, poros de la envoltura nuclear, fragmentos de microtúbulos). El ensamblaje de microtúbulos requiere la unión de monómeros para formar dímeros, formación de espirales y anillos, apertura de estas estructuras para formar protofilamentos, asociación de los protofilamentos en láminas, cierre de las láminas formando microtúbulos abiertos en C, cierre de las láminas formando microtúbulos. La elongación de los microtúbulos tiene lugar por la incorporación de dímeros en los extremos +. La dineína y la quinesina son dos ATPasas que hidrolizan ATP para generar energía mecánica y desplazar cargo sobre los microtúbulos (Lehninger, 2007).

Los patógenos bacterianos han desarrollado diferentes mecanismos para favorecer activamente su entrada en la célula hospedadora a través de la modulación de los citoesqueletos de actina y microtúbulos. Las GTPasas son enzimas claves en la regulación del citoesqueleto celular. La manipulación de dicho citoesqueleto por patógenos bacterianos está en numerosos casos condicionada por la subversión de la actividad de GTPasas eucariotas (Tsuda *et al.*, 2005).

iii) ***Guanine Triphosphatase***

Las *Guanine Triphosphatase* (GTPasas) son interruptores moleculares que regulan numerosas vías de transducción de señal. Las GTPasas inician estas cascadas de transducción de señal al interactuar y activar moléculas efectoras (Meyer & Feldman, 2002). La actividad de las GTPasas está regulada por tres grupos de proteínas: (i) los factores intercambiadores de nucleótidos de guanina GEFs (del inglés *guanine nucleotide exchange factors*), que promueven el intercambio de GDP por GTP para activar la GTPasa; (ii) las proteínas activadoras de la actividad intrínseca de GTPasas GAPs (del inglés *GTPase-activating proteins*) catalizan la hidrólisis del GTP unido a la GTPasa (forma GTPasa-GDP), favoreciendo un estado inactivo de la enzima; (iii) los inhibidores de disociación de nucleótidos de guanina GDIs (del inglés *guanine nucleotide dissociation inhibitors*), que bloquean las GTPasas, al secuestrar y solubilizar las formas GTPasa-GDP (**Fig. 3**) (Moon & Zheng, 2003).

Una familia de GTPasas con un papel esencial en el control del citoesqueleto celular es la familia Rho, una subfamilia de la superfamilia Ras, con más de 20 miembros, si bien destacamos tres de ellos, Rac, Cdc42 y RhoA. Además, se han identificado más de 40 efectores, 50 GEFs y 40 GAPs de la familia Rho en mamíferos (Bishop & Hall, 2000). Rac está implicado en la formación de lamelipodios; Cdc42 está

implicado en la formación de filopodios; RhoA está relacionado con la formación de fibras de estrés.

En las adhesiones focales, cuando se produce la activación de integrinas y el inicio de la señalización correspondiente, p130Cas se fosforila y recluta Crk, que interacciona con el GEF de Rac DOCK180. De la misma forma, paxilina se fosforila y recluta Crk promoviendo la activación de Rac y, a su vez, la reorganización del citoesqueleto. Por su parte, las tirosina quinasas de la familia Src promueven la activación de los GEFs de Rac Vav y Tiam (Guarino, 2010).

Una vez activada, Rac une y activan el efector PAK (del inglés *p21-activated kinase*) (del Pozo *et al.*, 2004). PAK es una serina-treonina quinasa que fosforila y activa LIMK (del inglés *LIM kinase*) el cual, a su vez, fosforila e inactiva cofilina (Edwards *et al.*, 1999). La cofilina facilita la disociación de los filamentos de actina, por lo que su inactivación favorece la forma F-actina. Por tanto, la transición entre las formas fosforilada-defosforilada de este conjunto de proteínas es crítico para la modulación del citoesqueleto de actina. Otras proteínas reguladoras de la polimerización de actina son los miembros de la familia WASp/SCAR/WAVE. En su estado activo, estas proteínas estimulan el complejo Arp2/3 (del inglés *actin related proteins*). Las proteínas WASp/WAVE pueden unirse a la profilina, una proteína de unión a actina involucrada en el equilibrio dinámico de ensamblaje del citoesqueleto de actina, y actuar de forma sinérgica con Arp2/3 en la polimerización de actina. Rac activa la familia Scar/WAVE indirectamente, a través del complejo adaptador Nck (Rohatgi *et al.*, 1999; Rohatgi *et al.*, 2001) (**Fig. 4**).

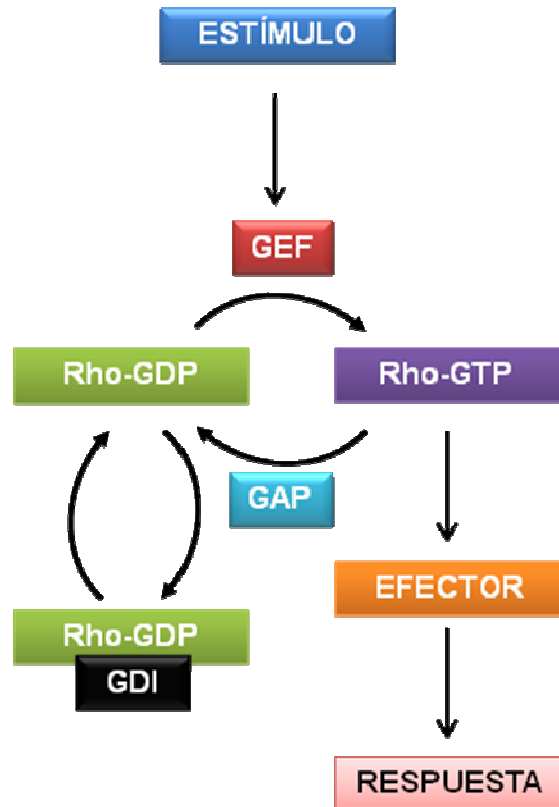


Figura 3. Regulación de la actividad de GTPasas. Los GEFs son activadores de GTPasas que catalizan el intercambio de GDP por GTP, activando la GTPasa (forma GTPasa-GTP). Las GTPasas-GTP inician cascadas de transducción de señal al interactuar y activar moléculas efectoras. Los GAPs son reguladores negativos de GTPasas que catalizan la hidrólisis del GTP unido a la GTPasa (forma GTPasa-GDP), favoreciendo un estado inactivo de la enzima. Los GDIs secuestran las formas GTPasa-GDP, limitando su recambio.

RhoA ejerce su actividad a través de 2 efectores: ROCK (del inglés *Rho-associated kinase*) y mDia (del inglés *mammalian diaphanous-related formins*). ROCK es una serina-treonina quinasa que, en su estado activo, y al igual que PAK, fosforila y activa LIMK que, a su vez, fosforila e inactiva a cofilina, induciendo la estabilización de los filamentos de actina (Sumi *et al.*, 2001). ROCK también fosforila e inactiva la fosfatasa MLC (del inglés *myosin light chain*), lo que aumenta la fosforilación de miosina, que se entrecruza con filamentos de actina, generando fuerzas contráctiles (Kawano *et al.*, 1999). mDia, al igual que ROCK, contribuye al ensamblaje de los filamentos de actina-miosina, a través de un mecanismo desconocido (**Fig. 4**).

Las Rho GTPasas también modulan la conformación del citoesqueleto de microtúbulos. RhoA promueve la estabilización de los microtúbulos a través de mDia, que interactúa directamente con los microtúbulos (Palazzo *et al.*, 2001). Rac, por otra parte, promueve la elongación de los microtúbulos a través de PAK. PAK fosforila e inactiva la proteína desestabilizadora de microtúbulos Op18/estatmina (Daub *et al.*, 2001) (**Fig. 5**).

Numerosos patógenos han desarrollado diferentes mecanismos para subvertir el citoesqueleto del hospedador a través de la manipulación de GTPasas. Por ejemplo, *Salmonella* manipula el citoesqueleto de actina al inyectar mediante un SST3 codificado por genes localizados en PAI SPI-1, efectores que mimetizan GEFs y GAPs de Rac1 y RhoA, lo que en último término facilita la invasión bacteriana (Boyle *et al.*, 2006). En cambio, *Yersinia pseudotuberculosis* subvierte el citoesqueleto de actina para impedir su internalización, al inyectar efectores que actúan como GAPs de GTPasas, bloqueando el proceso de fagocitosis por fagocitos profesionales (Etienne-Manneville & Hall, 2002).

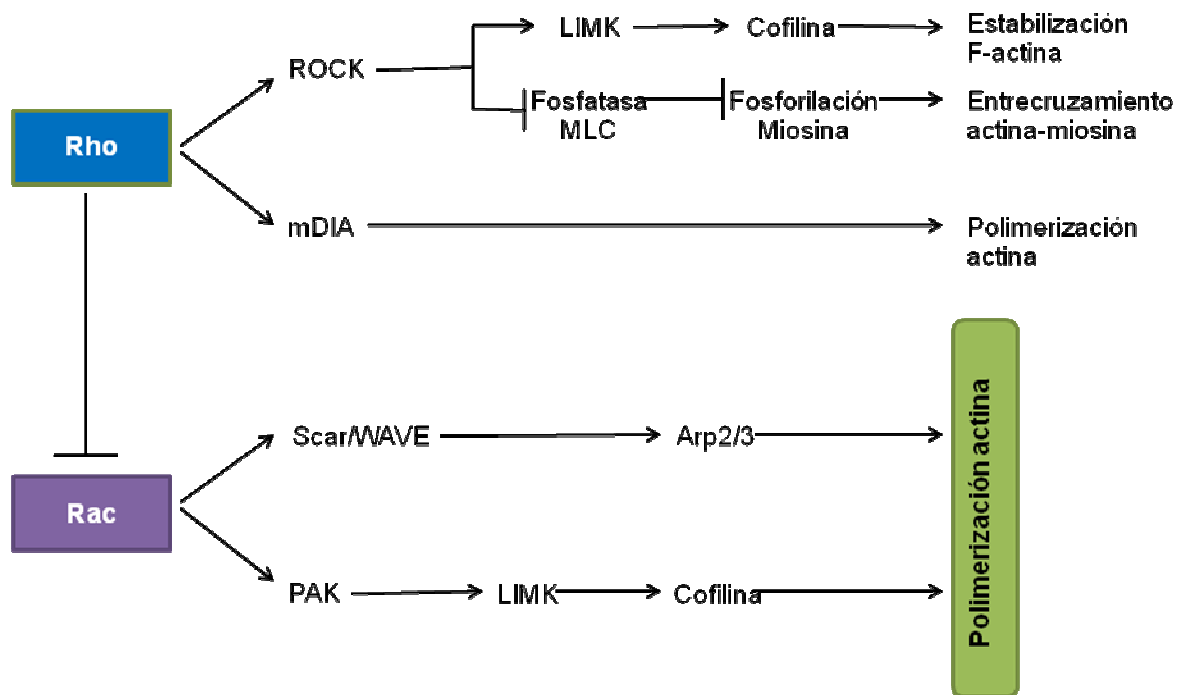


Figura 4. Las GTPasas de la familia Rho regulan la organización de los filamentos de actina. Rho promueve la contractilidad actina-miosina a través de dos efectores, mDia y ROCK. ROCK fosforila la quinasa LIM que, a su vez, promueve la fosforilación de cofilina. Por otra parte, la fosforilación de la fosfatasa MLC aumenta los niveles de fosforilación de MLC, favoreciendo el entrecruzamiento actina-miosina. Rac regula la polimerización del citoesqueleto de actina a través de la familia de proteínas WASp/Scar/WAVE, del complejo Arp2/3, y de PAK.

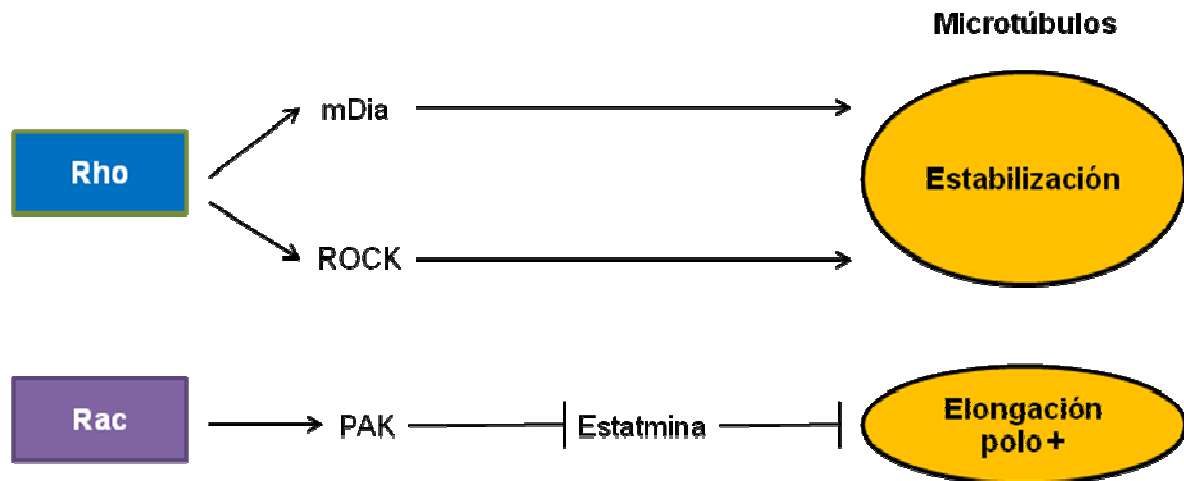


Figura 5. Regulación del citoesqueleto de microtúbulos por GTPasas de la familia Rho. La activación de Rho provoca la estabilización de los microtúbulos a través de un mecanismo desconocido en el que interviene mDia. Rac activa PAK, y éste fosforila e inactiva a Stathmina, una proteína desestabilizadora de los microtúbulos.

1.3.5. Fosfoinosítidos

Los fosfoinosítidos o inositol fosfatos son fosfolípidos que se encuentran en el lado citosólico de las membranas y que contienen en su estructura uno o más inositoles modificados por adición de uno o más grupos fosfato. La fosforilación reversible del anillo de inositol genera siete especies diferentes de fosfoinosítidos (**Fig. 6**). Los fosfoinosítidos tienen un importante papel regulador en la fisiología celular (Di Paolo & De Camilli, 2006).

El fosfatidilinositol 4,5 bifosfato ($\text{PtdIns}(4,5)\text{P}_2$ o $\text{PI}(4,5)\text{P}_2$) participa en la mayoría de eventos en los que está implicada la membrana plasmática celular. $\text{PtdIns}(4,5)\text{P}_2$ se genera a partir de la fosforilación de $\text{PtdIns}(4)\text{P}$ o $\text{PtdIns}(5)\text{P}$ (Yin & Janmey, 2003). A su vez, $\text{PtdIns}(4,5)\text{P}_2$ se fosforila generando $\text{PtdIns}(3,4,5)\text{P}_3$ a través de una reacción catalizada por fosfoinositol 3-quinasa (PI3K, del inglés *Phosphatidylinositol 3-Kinase*) (**Fig. 6**). PI3K se activa en respuesta a estímulos que conllevan la estimulación de factores de crecimiento, de tirosina quinasas de la familia Src, u otros (Cantley, 2002). $\text{PtdIns}(3,4,5)\text{P}_3$ tiene un papel fundamental en la fisiología de las células eucariotas, estando implicado en proliferación celular, migración, fago- y macropinocitosis, diferenciación, supervivencia y cambios metabólicos. $\text{PtdIns}(3,4,5)\text{P}_3$ recluta moléculas efectoras que activan cascadas de señalización. Entre los efectores de $\text{PtdIns}(3,4,5)\text{P}_3$ se encuentran varios GEFs y GAPs de las GTPasas (Cantley, 2002). El mecanismo por el cual los lípidos promueven la unión de GTP a Rac conlleva la interacción directa de $\text{PtdIns}(3,4,5)\text{P}_3$ con los GEFs de Rac. Los miembros de la familia de GEFs Dbl

contienen un dominio que une fosfolípidos. Por ejemplo, la unión de $\text{PtdIns}(3,4,5)\text{P}_3$ al GEF de Rac Vav2 estimula su actividad (Abe *et al.*, 2000). Otro efector de PI3K es Akt. Akt es una serina-treonina quinasa que regula el crecimiento, la transformación, la diferenciación y la supervivencia celular (Cantley, 2002). Fosfolipasa C (PLC, del inglés *Phospholipase C*) es otro efector de PI3K. PLC rompe enlaces diéster fosfóricos utilizando agua. Las PLCs participan en el metabolismo de los fosfatidilinositol bifosfato ($\text{PtdIns}(4,5)\text{P}_2$) y las vías dependientes de calcio de la señalización celular relacionados con lípidos. PLC hidroliza $\text{PtdIns}(4,5)\text{P}_2$ a inositol 1,4,5-trifosfato (IP_3) y diacilglicerol (DAG) (Smrcka *et al.*, 2012). IP_3 y DAG modulan la actividad de proteínas aguas abajo en la cascada de señalización celular. IP_3 es soluble, difunde a través del citoplasma e interactúa con receptores específicos en el retículo endoplásmico, lo que provoca la liberación de Ca^{2+} , elevando la $[\text{Ca}^{2+}]$ intracelular, lo que a su vez favorece la localización de PKC (Proteína Kinasa dependiente de Ca^{2+}) en la cara citosólica de la membrana plasmática (Suh *et al.*, 2008). En esta situación, PKC puede ser activada por DAG y así fosforilar sustratos específicos. PKC participa en (i) proliferación y diferenciación celular; (ii) apoptosis; (iii) remodelación del citoesqueleto; (iv) tráfico vesicular; (v) funciones endocrinas y neurotransmisión (Suh *et al.*, 2008).

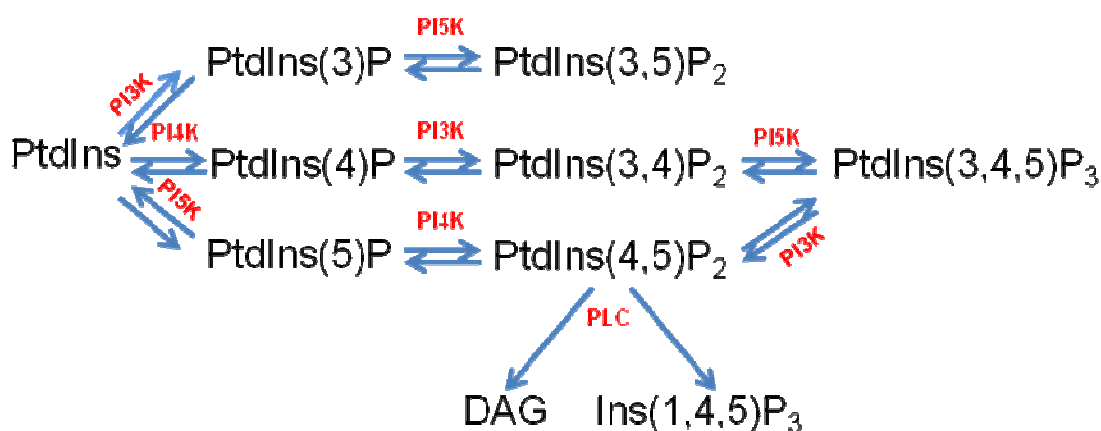


Figura 6. Reacciones metabólicas asociadas a la generación de las siete especies de PtdIns.

2. ESTRUCTURA Y CARACTERÍSTICAS GENERALES DEL TRACTO RESPIRATORIO

El sistema respiratorio humano, formado por los pulmones y por una secuencia de conductos aéreos que los comunican con el medio externo, proporciona oxígeno y elimina dióxido de carbono del organismo (Gartner & Hiatt, 2002). El tracto respiratorio

se divide anatómicamente en vías respiratorias superiores e inferiores. Las vías superiores incluyen la cavidad nasal y la faringe, en la cual se distingue la nasofaringe, que es el área donde desemboca la cavidad nasal, la orofaringe, área más cercana a la cavidad bucal, y la hipofaringe, área en contacto con la laringe. El tracto respiratorio inferior está compuesto por la laringe, la tráquea, los bronquios, los bronquiolos y los alveolos. Bronquiolos y alveolos están dentro de los pulmones, donde se realiza el intercambio gaseoso con el flujo sanguíneo (Gartner & Hiatt, 2002) (**Fig. 7**).

Las vías respiratorias superiores, excepto la cavidad nasal, están recubiertas por la mucosa respiratoria. La mucosa respiratoria es un epitelio cilíndrico ciliado pseudoestratificado donde todas las células están en contacto con la membrana basal pero no todas llegan a la luz del conducto respiratorio. Los tipos celulares presentes en la mucosa respiratoria son las células cilíndricas ciliadas, las células basales y las células caliciformes. Los tres tipos celulares se encuentran en proporción similar (Gartner & Hiatt, 2002). Las células cilíndricas ciliadas son alargadas y polarizadas. Poseen un núcleo localizado en la base y presentan cilios y microvellosidades en su membrana apical en contacto con la luz del conducto respiratorio. Los cilios están cubiertos por una capa de fluido acuoso que contribuye al movimiento ciliar y por una capa gelatinosa, o moco, situada por encima de la capa acuosa. El moco tiene función protectora, atrapa material particulado y/o microorganismos, y evita su contacto directo con el epitelio. El batido muco-ciliar provoca el desplazamiento del moco y de las partículas atrapadas en él hacia la nasofaringe para su expulsión. Las células cilíndricas ciliadas producen el fluido acuoso superficial de las vías respiratorias que recubre todo el epitelio en contacto con el medio externo. Las células basales no son alargadas y su superficie apical no llega a la luz del conducto respiratorio. Son poco diferenciadas y reemplazan células caliciformes y cilíndricas ciliadas muertas. Las células caliciformes tienen un tallo estrecho situado basalmente y una teca expandida que contiene gránulos secretorios. Estas células secretan mucina y otras glicoproteínas a la luz de las vías respiratorias, generando la capa de moco (Gartner & Hiatt, 2002).

La laringe es un tubo cilíndrico corto y rígido situado entre la faringe y la tráquea, que impide la entrada de sólidos durante la deglución y es responsable de la fonación. Está revestida de mucosa respiratoria, excepto en las regiones superiores de la epiglotis y las cuerdas vocales, donde está revestida interiormente por epitelio escamoso estratificado. La tráquea es el conducto que continúa la laringe y termina bifurcándose en los bronquios. En su exterior, está sustentada por anillos de cartílago hialino abiertos en su parte dorsal que impiden que el conducto se cierre. En esta región se sitúa una membrana formada por fibras musculares lisas responsables del

reflejo de la tos. La tráquea y los bronquios son muy sensibles a la presión ligera, de forma que cuando se detecta material particulado o irritantes químicos, las fibras musculares se contraen y se crea una corriente explosiva de aire que ayuda a eliminar las partículas de los conductos respiratorios (Guyton *et al.*, 2006). Los bronquios primarios generan los bronquios secundarios, terciarios, bronquiolos, bronquios terminales y bronquiolos respiratorios que desembocan en los alveolos. A partir de los bronquiolos, desaparece el epitelio cilíndrico pseudoestratificado, dando paso a un epitelio escamoso simple en las zonas de intercambio gaseoso o alveolos (Gartner & Hiatt, 2002) (**Fig. 7**).

El epitelio escamoso de los alveolos está formado por los neumocitos o células epiteliales alveolares (**Fig. 7**). Los neumocitos tipo I representan el 95% de la superficie alveolar y forman el componente epitelial de la fina barrera que separa el espacio alveolar de los vasos sanguíneos. Los neumocitos tipo I forman uniones oclusivas que recubren el alveolo, evitando el escape del líquido tisular a la luz alveolar. Los neumocitos tipo II ocupan un 5% de la superficie alveolar (Fereol *et al.*, 2008; Gartner & Hiatt, 2002). Sin embargo, son más numerosos que los de tipo I, representando el 60% de las células del epitelio alveolar y el 10-15% del total de las células del pulmón. Los neumocitos tipo II son células esféricas. Están encargadas de mantener la homeostasis del alveolo (Mason, 2006). Para ello, cumplen con las funciones de síntesis, secreción y reabsorción del surfactante pulmonar, un agente tensoactivo que impide el colapso de los alveolos y que tiene actividades antimicrobiana y antiinflamatoria (Gartner & Hiatt, 2002). Asimismo, los neumocitos tipo II intervienen en el transporte de agua y sodio, en el metabolismo de compuestos xenobióticos y en la regeneración del epitelio alveolar. Los neumocitos tipo II juegan también un papel activo en la respuesta pulmonar defensiva frente al ataque por microorganismos patógenos: (i) reconocen patrones moleculares asociados a patógenos (PAMPs, del inglés *pathogen associated molecular patterns*) a través de receptores de reconocimiento de PAMPs (PRRs, del inglés *pattern recognition receptors*), lo que determina la modulación (activación o inhibición, según el caso) de cascadas de transducción de señales; (ii) secretan péptidos antimicrobianos, (iii) secretan citoquinas y quimioquinas, mediadores pro-inflamatorios que orquestan respuestas inflamatorias en el hospedador; (iv) forman una barrera física que impide el paso de patógenos al torrente sanguíneo, limitando la infección sistémica (Castranova *et al.*, 1998; Gartner & Hiatt, 2002; Mason, 2006). Dado su papel esencial en el mantenimiento de la función pulmonar y de la inmunidad celular innata respiratoria, los neumocitos tipo II han sido el principal tipo celular objeto de estudio en esta Tesis Doctoral.

2.1. Inmunidad innata humoral y celular del tracto respiratorio

Las células respiratorias producen un conjunto de moléculas que contribuyen a la eliminación de microorganismos. Estas moléculas están presentes en el fluido acuoso superficial del tracto respiratorio y actúan como sistema de defensa mediante la disrupción selectiva de la pared celular bacteriana, el secuestro de nutrientes bacterianos o la opsonización de microorganismos, para facilitar su fagocitosis. Los principales factores solubles de la inmunidad innata respiratoria son el sistema de complemento, los péptidos antimicrobianos, el surfactante pulmonar y enzimas solubles como lisozima, lactoferrina, o inhibidor de proteasas SLPI (del inglés *Secretory Leukoprotease Inhibitor*).

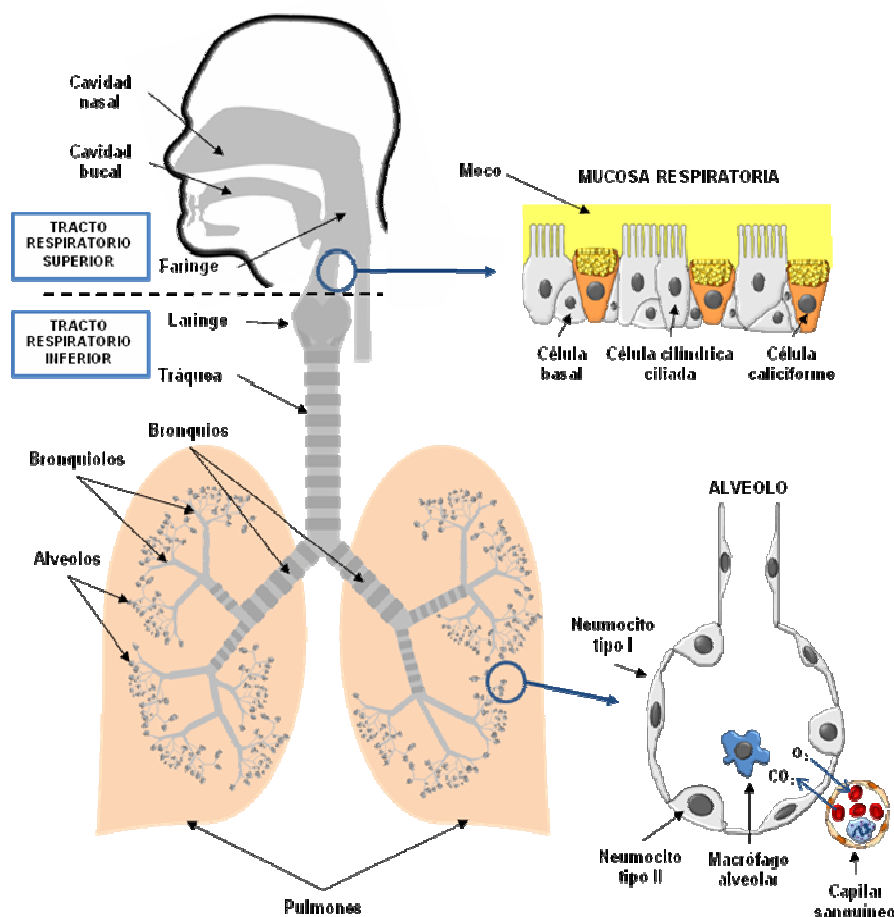


Figura 7. Representación esquemática del tracto respiratorio humano. Detalles de la mucosa respiratoria a nivel de la faringe (arriba, derecha) y de un alveolo (abajo, derecha).

El **sistema del complemento** es un conjunto de proteínas y glicoproteínas organizadas en cascadas, sintetizadas principalmente por células hepáticas, que se encuentran en su mayor parte circulando en el torrente sanguíneo en conformación inactiva. Los componentes del sistema del complemento también se sintetizan de

forma local en tejidos periféricos. Así, las proteínas de complemento están presentes en el fluido del lavado broncoalveolar de los pulmones (Bolger *et al.*, 2007; Watford *et al.*, 2000). Los neumocitos tipo II, los macrófagos alveolares, los neutrófilos y los fibroblastos sintetizan y secretan proteínas integrantes de las vías clásica (C2, C3, C4 y C5) y alternativa (factor B). Los niveles de síntesis y secreción de estas proteínas aumentan cuando las células productoras reciben estímulos inflamatorios (Bolger *et al.*, 2007; Hogasen *et al.*, 1995; Rothman *et al.*, 1990; Strunk *et al.*, 1988; Watford *et al.*, 2000). La activación de los componentes del sistema de complemento se produce mediante la escisión proteolítica de una porción inhibitoria de cada proteína. La proteína adquiere entonces una conformación activa. Existen tres vías de activación del sistema de complemento: vía clásica, vía alternativa y vía de las lectinas, que convergen en las convertasas de C3. La actividad de las convertasas de C3 tiene como consecuencia última la formación del complejo de ataque a membrana, que genera poros en la membrana de la bacteria provocando su lisis. La vía clásica se activa por complejos antígeno-anticuerpo que desencadenan la activación sucesiva de C1, C2, C4 y C3. La vía clásica también se activa mediante la unión dependiente de calcio de proteína C reactiva (CRP, del inglés *C reactive protein*), una proteína de fase aguda presente en el suero humano cuando se produce una respuesta inflamatoria. CRP se une a C1 para activar la vía clásica del complemento (Roitt & Delves, 2006; Volanakis & Kaplan, 1974; Weiser & Pan, 1998). La activación de la vía alternativa es independiente de anticuerpos y se basa en el reconocimiento de componentes de la superficie bacteriana y la deposición de C3b sobre dicha superficie. Una vez unido a la bacteria, C3b interacciona con las proteínas Factor B y Factor D para generar convertasa de C3. La vía de las lectinas se basa en la afinidad de la proteína MBL (del inglés *Mannose binding lectin*) por residuos de manosa presentes en la superficie de algunas bacterias. Una vez unida al microorganismo, MBL activa C2 y C4 para generar convertasa de C3. Además de la lisis de microorganismos, el sistema de complemento participa en la respuesta inmune mediante la opsonización de microorganismos, lo que facilita su fagocitosis. Asimismo, C3a y C5a actúan como mediadores quimiotácticos en la respuesta inflamatoria (Goldsby *et al.*, 2002; Roitt & Delves, 2006). Los patógenos bacterianos han desarrollado la habilidad para escapar del ataque bactericida del complemento mediante: (i) reclutamiento de reguladores de la actividad del complemento (Kraiczy & Wurzner, 2006); (ii) modulación o inhibición de componentes del complemento por interacción directa (Joiner *et al.*, 1983); (iii) inactivación del sistema del complemento mediante degradación enzimática a través de proteasas bacterianas (Rooijackers & van Strijp, 2007).

Los **péptidos antimicrobianos** (PAs) son péptidos con actividad bactericida. Se unen a las membranas bacterianas y desestabilizan las bicapas lipídicas de las mismas (membranas externa e interna), lo que genera la pérdida de componentes celulares y la disipación del potencial de membrana (Hancock & Scott, 2000; Jenssen *et al.*, 2006; Melo *et al.*, 2009). Las células del epitelio respiratorio humano producen dos tipos de péptidos antimicrobianos, defensinas y catelicidina LL-37/hCAP-18. Su expresión puede ser constitutiva (β -defensina 1) o inducida por estímulos inflamatorios (β -defensina 2) (Hertz *et al.*, 2003; Moranta *et al.*, 2009). Los PAs también modulan la activación de las cascadas inflamatorias, activan el sistema de complemento, ejercen actividad quimiotáctica sobre fagocitos y contribuyen a la reparación tisular (Bals, 2000; Bals & Wilson, 2003; Elsbach, 2003).

La actividad de los PAs conlleva: (i) atracción entre péptido y superficie de la célula diana a través de uniones electrostáticas; (ii) anclaje del PA a la bicapa lipídica; (iii) permeabilización de la membrana bacteriana/formación de poro por PAs. La acción bactericida de los PAs implica formación de canales instantáneos, disolución de la membrana bacteriana o translocación del PA a través de membrana y ejercicio de su acción bactericida en el citosol bacteriano.

Los patógenos bacterianos han adoptado estrategias diversas para evitar la muerte por PAs: (i) modificación de la superficie bacteriana (Abachin *et al.*, 2002; Peschel, 2002; Poyart *et al.*, 2003); (ii) mecanismos externos de captura (Jin *et al.*, 2004); (iii) bombas de expulsión (Shafer *et al.*, 1998); (iv) peptidasas (Schmidtchen *et al.*, 2002); (v) alteración de la producción de péptidos antimicrobianos (Islam *et al.*, 2001).

El **surfactante pulmonar** es un complejo lipoproteico secretado por los neumocitos tipo II que cubre el espacio alveolar. Reduce la tensión superficial en la interfase aire-líquido y previene el colapso de los alveolos durante la expiración. Dipalmitoil fosfatidilcolina es un componente lipídico del surfactante que interviene en la reducción de la tensión superficial. Las proteínas del surfactante pulmonar (SP) son A, B, C y D (SP-A, del inglés *Surfactant Protein A*), también denominadas colectinas. SP-B y SP-C son proteínas hidrofóbicas con función biofísica. Las colectinas SP-A y SP-D presentan papeles destacados en la inmunidad innata. Estas proteínas hidrofílicas interactúan y eliminan un rango amplio de bacterias (Schaeffer *et al.*, 2004; Wright, 2005; Wu *et al.*, 2003). La unión colectina-bacteria puede ocasionar la agregación, la inhibición del crecimiento o la neutralización del microorganismo. Por otra parte, SP-A y SP-D actúan como opsoninas, favoreciendo la fagocitosis de varios

patógenos bacterianos. Las colectinas también regulan la expresión de receptores celulares implicados en el reconocimiento bacteriano y son moduladores de la respuesta inflamatoria (Beharka *et al.*, 2002; Kuroki *et al.*, 2007; Wright, 2005).

Enzimas solubles: la lisozima y la lactoferrina son las dos proteínas más abundantes del líquido alveolar. La lisozima es una proteína secretada por neutrófilos, monocitos, macrófagos y células epiteliales que hidroliza enlaces entre azúcares del peptidoglicano bacteriano actuando como agente antimicrobiano, y que también actúa como opsonina (Cole *et al.*, 2002). La lactoferrina es una proteína producida por neutrófilos y células epiteliales que une hierro y posee efecto bactericida (Brogden, 2005). Se une al lípido A bacteriano y puede actuar de forma sinérgica con la lisozima (Appelmelk *et al.*, 1994; Jones *et al.*, 1994). Asimismo, previene el desarrollo de biopelículas bacterianas (Singh *et al.*, 2002). La anti-proteasa SLPI es una proteína de fase aguda presente en el fluido superficial del tracto respiratorio que confiere protección frente a las proteasas secretadas por neutrófilos y que posee actividad bactericida (Masuda *et al.*, 1995).

Los efectores de la inmunidad innata celular del tracto respiratorio son el epitelio y los macrófagos.

Los **macrófagos** son células mononucleares que provienen de monocitos sanguíneos generados durante la hematopoyesis en la médula ósea. Son células altamente fagocíticas que ingieren material exógeno de entre 0.4 y 25 μm de diámetro, previamente reconocido a través de un amplio espectro de receptores celulares. Estos receptores reconocen y se unen a ligandos presentes en la superficie bacteriana o a las opsoninas que recubren los microorganismos. La unión ligando-receptor determina el inicio del proceso de fagocitosis. La partícula es rodeada por pseudópodos, protrusiones de la membrana del fagocito producidas mediante la reorganización coordinada de su citoesqueleto, e internalizada en una vesícula llamada fagosoma (Haas, 2007; Vieira *et al.*, 2002). El fagosoma pierde los marcadores de la superficie celular y se integra en la ruta endocítica mediante eventos de fusión que comunican de forma unidireccional fagosomas tempranos, fagosomas tardíos y fagolisosomas. El fagolisosoma es el compartimento final de maduración donde la carga internalizada es degradada. Un evento central en la maduración de los fagosomas es la acidificación progresiva del lumen hasta valores aproximados de pH 4.0 debido a la acción de una bomba de protones integrada en la membrana vacuolar, el complejo ATPasa vacuolar o vATPasa (Lukacs *et al.*, 1990). El pH ácido, unido a la acción de hidrolasas

lisosomales de la familia de las catepsinas, provoca la degradación del material fagocitado (Gruenberg & van der Goot, 2006).

El **epitelio respiratorio** es otro elemento esencial integrante de la inmunidad innata respiratoria, cuyas características han sido descritas al comienzo de esta sección. Para mantener la integridad tisular, el epitelio respiratorio ha adoptado una serie de medidas: (i) recambio celular. Las células que componen el epitelio continuamente están renovándose para prevenir la colonización persistente. Cuando el epitelio sufre una infección bacteriana, el recambio celular se acelera para combatir la infección. Hay patógenos que han adoptado medidas para contrarrestar este recambio celular. Algunas bacterias secretan proteínas al interior de la célula hospedadora que interfieren con la progresión del ciclo celular (Iwai *et al.*, 2007; Mimuro *et al.*, 2007). (ii) Descamación. Las células están unidas entre sí y adheridas sobre la membrana basal. Cuando las células están dañadas se despegan de la membrana basal lo que, en el caso de células infectadas, arrastraría las bacterias. Algunos patógenos son capaces de subvertir el fenómeno de descamación. *Neisseria gonorrhoeae* expresa una proteína Opa, que reconoce a CEACAM (del inglés, *Carcinoembryonic Antigen-related cell adhesion molecules*). La unión Opa-CEACAM aumenta la expresión de CD105, un receptor de la familia TGF- β 1 (del inglés, *Transforming Growth Factor*). CD105 promueve la adhesión celular a la matriz extracelular evitando la descamación (Muenzner *et al.*, 2005). (iii) Uniones célula-célula. Las células poseen proteínas encargadas de mantener las uniones célula-célula (en inglés *scaffold proteins*), incluyendo las proteínas ZO (del inglés, *Zonula occludens*), las claudinas y las ocludinas. Los patógenos bacterianos han adoptado diversas estrategias para disrumpir las uniones célula-célula y así expandir la superficie epitelial o translocarse al interior del tejido (Boyle *et al.*, 2006; Saadat *et al.*, 2007). (iv) Apoptosis o muerte celular como mecanismo de defensa. Algunos patógenos poseen actividad antiapoptótica para evadir este mecanismo de defensa de la célula hospedadora y mantener un nicho replicativo. Estos patógenos inhiben la activación de proteínas proapoptóticas como Bax y Bak, bloqueando la liberación de citocromo C de la mitocondria (Xiao *et al.*, 2004). (v) Autofagia. Si bien es un sistema de degradación de material presente en las células eucariotas que facilita el reciclaje de orgánulos dañados, y proteínas mal plegadas, algunos patógenos son capaces de evadir el proceso de autofagia y evitar ser eliminados (Ogawa *et al.*, 2005; Yoshikawa *et al.*, 2009).

2.2. Microbiota normal del tracto respiratorio

Tras el nacimiento, la piel y las mucosas del neonato son colonizadas por microorganismos que constituyen la microbiota normal de cada individuo. El tracto respiratorio está en contacto con el medio externo mediante la inhalación de aire y se encuentra permanentemente colonizado por microorganismos. La microbiota bacteriana del tracto respiratorio está sometida a un recambio constante, es decir, las bacterias son adquiridas y eliminadas numerosas veces durante la vida (García-Rodríguez & Fresnadillo Martínez, 2002; Samuelson *et al.*, 1995). Los microorganismos colonizadores que constituyen la microbiota respiratoria humana son comensales y/o patógenos oportunistas. En la nariz y la faringe residen bacterias Gram positivas (estreptococos α y β hemolíticos, *Corynebacterium*) y Gram negativas (*Moraxella* spp., *Neisseria* spp., *Haemophilus* spp., *Porphyrromonas* spp., *Lactobacillus* spp., *Fusobacterium* spp., *Bacteroides* spp., *Mycoplasma pneumoniae*) (Hull & Chow, 2007). La colonización del tracto respiratorio superior es asintomática, y confiere protección frente a la infección por microorganismos que no forman parte de la microbiota normal (Blaser & Falkow, 2009). Diversas circunstancias tales como alteraciones genéticas, alteraciones del sistema inmune, edad, actividad laboral, hábitos sociales, etc., favorecen que los patógenos oportunistas de la microbiota normal causen infecciones sintomáticas, agudas o crónicas (Blaser & Falkow, 2009; García-Rodríguez & Fresnadillo Martínez, 2002; Hull & Chow, 2007; Tlaskalova-Hogenova *et al.*, 2004). Las principales infecciones agudas asociadas a estos microorganismos son: faringitis (causada por *Streptococcus pyogenes*), otitis media (*Streptococcus pneumoniae*, *Haemophilus influenzae*, *Moraxella catarrhalis*), sinusitis (*S. pneumoniae*, *H. influenzae*, *S. pyogenes*), meningitis (*Neisseria meningitidis*, *H. influenzae*), epiglotitis (*M. pneumoniae*, *H. influenzae*), bronquitis (*M. pneumoniae*, *H. influenzae*), y neumonía (*S. pneumoniae*, *H. influenzae*). Por otra parte, existe un repertorio de enfermedades respiratorias crónicas que incluye enfermedad pulmonar obstructiva crónica (EPOC), enfisema severo, bronquiectasis, asma bronquial, apnea obstructiva, fibrosis quística o bronquitis crónica, cuyos pacientes presentan deficiencias de tipo inmunológico, como consecuencia de las cuales sufren infecciones bacterianas agudas y/o crónicas causadas por algunos de los patógenos oportunistas señalados previamente.

En este trabajo, hemos prestado especial atención a las infecciones bacterianas asociadas a la EPOC, cuyas características generales se resumen a continuación.

2.3. Aspectos generales de la Enfermedad Pulmonar Obstructiva Crónica (EPOC)

La Enfermedad Pulmonar Obstructiva Crónica (EPOC) se caracteriza por la obstrucción progresiva e irreversible de los espacios de intercambio gaseoso que lleva asociada la pérdida/destrucción del tejido pulmonar (enfisema) y la remodelación del tejido pulmonar (fibrosis). Enfisema y fibrosis contribuyen a la pérdida progresiva de la función pulmonar, a la reducción de la calidad de vida del paciente y al aumento de la mortalidad (MacNee, 2005; Taylor, 2010).

El consumo de tabaco es el factor de riesgo principal en el desarrollo de la EPOC. Otros factores de riesgo son la contaminación del aire inhalado por combustión de biomasa, las infecciones víricas, y la exposición ocupacional a partículas de polvo inorgánico o a agentes químicos nocivos (Gump *et al.*, 1976). En términos globales, la EPOC afecta al 10% de la población total y al 50% de los fumadores habituales en países industrializados, donde es la cuarta causa de muerte. Además, estudios predictivos apuntan que será la tercera causa de muerte a nivel mundial en 2020 (Rabe *et al.*, 2007). En la Unión Europea, los costes derivados del tratamiento de la EPOC se estiman en 3% del gasto sanitario total y en 56% del gasto destinado a enfermedades respiratorias (Rabe *et al.*, 2007).

Las partículas y los gases nocivos presentes en el tabaco provocan cambios en el sistema inmune del fumador que generan una inflamación pulmonar elevada y crónica. Esta condición inflamatoria crónica provoca cambios patológicos como son la bronquitis obstructiva crónica con fibrosis y consiguiente obstrucción de las vías aéreas menores, la generación de enfisema con destrucción del parénquima pulmonar, y la pérdida de elasticidad pulmonar (Barnes, 2004; Cosio *et al.*, 2009). El tabaco favorece también el desarrollo de infecciones pulmonares provocadas por bacterias y virus. Estos microorganismos, individualmente o en co-infección, causan un porcentaje alto (entorno al 65%) de las agudizaciones periódicas que sufren los enfermos EPOC. Estas agudizaciones frecuentes se denominan exacerbaciones (Celli & Barnes, 2007). Una exacerbación es un incremento agudo de los síntomas de la EPOC que requiere intervención médica. Las exacerbaciones son el principal factor de morbilidad y mortalidad de los pacientes EPOC, y generan un gasto elevado para los sistemas sanitarios nacionales, dado que conllevan la aplicación de tratamientos específicos y, en ocasiones, la hospitalización (Barnes, 2007; Barnes & Celli, 2009). Una consecuencia adicional del tabaquismo es la infección crónica de las vías respiratorias bajas por patógenos oportunistas. La infección pulmonar crónica en enfermos EPOC perpetúa la inflamación y contribuye a la progresión irreversible de la enfermedad (Drannik *et al.*, 2004; Sethi & Murphy, 2008). El tabaco daña la barrera muco-ciliar, produce hipersecreción mucosa, daña las propiedades elásticas del epitelio pulmonar y disminuye la capacidad fagocítica profesional. Estas alteraciones

favorecen la llegada de microorganismos a las vías respiratorias bajas, facilitando la colonización bacteriana de este nicho, la amplificación de la respuesta inflamatoria debido al reconocimiento de los PAMPs de dichos microorganismos, y la consiguiente activación y/o reclutamiento de fagocitos profesionales que amplifican el daño epitelial producido por el tabaco. La amplificación del daño pulmonar favorece a su vez el acceso de nuevos patógenos al pulmón. Por tanto, la infección crónica contribuye al deterioro del aparato respiratorio, al mal funcionamiento de la inmunidad del individuo y al acceso de microorganismos al tracto respiratorio inferior en un bucle sin fin. Este círculo vicioso amplifica indefinidamente tanto la inflamación como la infección crónica y contribuye a la progresión irreversible de la enfermedad respiratoria (Rao *et al.*, 1999; Sethi & Murphy, 2008). *Haemophilus influenzae*, *Streptococcus pneumoniae*, *Moraxella catarrhalis* y *Pseudomonas aeruginosa* son los patógenos más frecuentemente aislados en exacerbación microbiana de EPOC (Murphy *et al.*, 2004; Murphy *et al.*, 2008).

Dada la relevancia sanitaria y económica de las infecciones crónicas y de las exacerbaciones microbianas de EPOC, conocer los mecanismos de patogénesis empleados por los microorganismos causantes de las mismas resulta esencial para la mejora en el tratamiento de la enfermedad respiratoria. La bacteria *Haemophilus influenzae* no tipable (HiNT) causa infecciones crónicas en las vías respiratorias bajas y es responsable de un alto porcentaje de exacerbaciones en pacientes EPOC. Los mecanismos moleculares de patogénesis de HiNT han sido objeto de estudio en esta Tesis Doctoral.

3. *Haemophilus influenzae* NO TIPABLE: UN PATÓGENO OPORTUNISTA DEL TRACTO RESPIRATORIO HUMANO

3.1. Características generales de *Haemophilus influenzae*

Haemophilus, del griego, amante de la sangre (*haima*, sangre; *philos*, amante); *influenzae*, del italiano, *influenza*, gripe. *H. influenzae* fue descrito por primera vez en 1892 tras ser aislado en individuos enfermos durante una pandemia de gripe (Kilian, 2005). *H. influenzae* pertenece a la clase Gammaproteobacteria, orden Pasteurellales, familia Pasteurellaceae, género *Haemophilus*. Es un cocobacilo (0,3-0,5 µm x 0,5-3,0 µm) pleomórfico, Gram negativo y anaeróbico facultativo. Para crecer, esta bacteria requiere factores de crecimiento, en concreto una fuente de grupos hemo (factor X) y nicotinamida adenin dinucleótido (β-NAD, factor V). La caracterización bioquímica de

H. influenzae se resume en la **Tabla 1**. Las cepas de *H. influenzae* se clasifican en siete biovars en base a tres características: producción de indol, actividad ureasa y actividad ornitina decarboxilasa.

H. influenzae crece a 37°C en los medios de Agar-chocolate e Infusión de Cerebro y Corazón (BHI, del inglés *Brain Heart Infusion*) suplementado con hemina y β -NAD (sBHI), en condiciones aeróbicas con elevada tensión de CO₂. El crecimiento de *H. influenzae* en placas de Agar-chocolate genera colonias lisas, bajas, convexas, grisáceas y translúcidas. Los aislados de *H. influenzae* pueden ser capsulados o no capsulados. Tras 24 h de incubación, las colonias de cepas no capsuladas presentan un diámetro de 0,5 a 1,0 mm; las colonias de cepas capsuladas presentan un diámetro de 1-3 mm y aspecto mucoso (Kilian *et al.*, 2005; Poje *et al.*, 2003).

Se han identificado seis serotipos capsulares (a-f) (Pittman 1931). Las cepas no capsuladas se denominan no tipables (HiNT). La mayor parte de las cepas no capsuladas pertenecen a los biovars II y III; la mayoría de las cepas capsuladas de serotipo b pertenecen al biovar I (Kilian, 2005). Las cepas capsuladas presentan poca diversidad genética, mientras que la población de HiNT es diversa y heterogénea.

3.2. Dualidad colonizador-patógeno de *Haemophilus influenzae*

H. influenzae forma parte de la microbiota nasofaríngea humana. Se transmite por inhalación a través de aerosoles o por contacto directo con las secreciones respiratorias. Un individuo puede estar colonizado simultáneamente por varias cepas distintas que además cambian a lo largo de su vida (Murphy *et al.*, 1999). La proporción de cepas capsuladas en la microbiota normal es baja (2-7% de todas las cepas de *H. influenzae*). La asistencia a guardería y el número de hermanos condicionan la tasa de renovación de cepas pediátricas. En adultos, la presencia de niños en el hogar, el tabaquismo y la obesidad condicionan los niveles de colonización por HiNT (García-Rodríguez & Fresnadillo Martínez, 2002).

Tabla 1: Caracterización bioquímica de *H. influenzae*.

Producción de gas a partir de D-Glucosa	Catalasa	Oxidasa	Hemólisis	Reducción de nitratos	Reducción de nitritos	α -Galactosidasa	β -Galactosidasa	α -Glucosidasa	β -Glucosidasa	α -Manosidasa	β -Xilosidasa	α -Fucosidasa	Fosfatasa alcalina	Requerimiento factor V	Requerimiento factor X	Arginina dihidrolasa	Producción de indol	Ureasa	Ornitina decarboxilasa
-	+	+	-	+	-	-	-	-	-	-	-	-	+	+	+	-	*	*	*

Introducción

Producción de ácido a partir de	D-Glucosa	D-Fructosa	Sacarosa	Lactosa	D-xilosa	D-ribosa	D-manosa	D-manitol	D-sorbitol	L-Arabinosa	L-Ramnosa	D-Galactosa	Sorbosa	Inulin	Maltosa	Glicerol	Inositol	Xilitol	Dulcitol
	+	-	-	-	+	+	-	-	-	-	-	+	-	-	+	-	-	-	-

Biovars de <i>H. influenzae</i>							
	I	II	III	IV	V	VI	VII
Indol	+	+	-	-	+	-	+
Ureasa	+	+	+	+	-	-	-
Ornitina decarboxilasa	+	-	-	+	+	+	-

Adaptado de Kilian (2005)

H. influenzae presenta una dualidad colonizador-patógeno relacionada con desequilibrios en la dinámica de colonización (Foxwell *et al.*, 1998). Cambios en el hospedador o en la capacidad adaptativa de HiNT permiten al microorganismo alcanzar nuevos nichos y establecerse en ellos (Foxwell *et al.*, 1998). Por ejemplo, el tabaquismo provoca hiperplasia en las células caliciformes, hipersecreción de moco y disfunción muco-ciliar, lo que facilita la infección crónica de las vías respiratorias bajas (Sopori, 2002). Por otra parte, la infección por el virus respiratorio sincitial disminuye la expresión de β -defensina II en las vías respiratorias altas, lo que se asocia con el aumento en la tasa de colonización del tracto respiratorio superior por HiNT y una mayor probabilidad de sufrir otitis media (McGillivray *et al.*, 2009). En conjunto, como consecuencia de desequilibrios en el hospedador, *H. influenzae* se convierte en un patógeno oportunista.

H. influenzae tipo b ha sido históricamente una causa importante de meningitis bacteriana infantil, además de causar epiglotitis, artritis, celulitis y neumonías agudas (Kilian, 2005; Rao *et al.*, 1999). El suministro de una vacuna conjugada basada en la cápsula de *H. influenzae* tipo b ha disminuido las infecciones invasivas provocadas por este patógeno (Peltola, 2000) hasta su práctica erradicación. Si bien algunas cepas capsuladas no tipo b causan neumonía (Kilian, 2005), HiNT es el patógeno de esta especie que tiene un mayor impacto clínico en la actualidad. HiNT es la causa más común de otitis media crónica con efusión en niños y el segundo agente causante de otitis media aguda (Rao *et al.*, 1999). Asimismo, HiNT es uno de los principales agentes etiológicos de neumonía adquirida en la comunidad en niños y ancianos, bronquitis aguda, sinusitis o conjuntivitis. Por otra parte, HiNT causa infecciones crónicas del tracto respiratorio inferior en individuos que sufren enfermedades

respiratorias crónicas asociadas al tabaquismo como EPOC y bronquitis crónica (**Tabla 2**).

En EPOC, la infección crónica por HiNT contribuye a la progresión de la enfermedad y causa aproximadamente 40% de las exacerbaciones (Sethi and Murphy, 2008). El análisis de poblaciones bacterianas en esputos expectorados o en broncoscopias de pacientes EPOC muestra colonización simultánea por múltiples cepas de HiNT con diferentes susceptibilidades antibióticas (Murphy *et al.*, 1999). Asimismo, se ha observado la colonización de pacientes EPOC con cepas de HiNT isogénicas en visitas clínicas consecutivas (Murphy *et al.*, 2004). Si bien estas cepas colonizadoras provocan una respuesta inflamatoria en el hospedador, esta respuesta no es efectiva en la eliminación del patógeno, dado que la colonización se cronifica y no es erradicada.

Las cepas de HiNT aisladas en exacerbaciones de EPOC son con frecuencia cepas de nueva adquisición (Sethi *et al.*, 2002). Las cepas de HiNT de “nueva entrada” inducen mayor inflamación de las vías aéreas y se adhieren mejor al epitelio respiratorio que las cepas colonizadoras (Bresser *et al.*, 1997; Chin *et al.*, 2005; Look *et al.*, 2006). Además, cepas de HiNT aisladas del tracto respiratorio inferior relacionadas con exacerbaciones de EPOC muestran una resistencia al ataque bactericida del complemento mayor que cepas aisladas de portadores sanos (Nakamura *et al.*, 2011). Por otra parte, los pacientes EPOC producen anticuerpos frente a epítomos específicos expuestos en la superficie de cada cepa de HiNT. Esta respuesta adaptativa es específica de cepa, de forma que protege contra exacerbaciones recurrentes causadas por cepas homólogas, no contra exacerbaciones causadas por cepas heterólogas antigénicamente distintas. En conjunto, esta respuesta inmunológica cepa-específica favorece las exacerbaciones provocadas por cepas de nueva adquisición (Sethi *et al.*, 2004).

Tabla 2: Patogénesis de *H. influenzae* tipo b y de HiNT.

	<i>H. influenzae</i> tipo b	HiNT
Rango de edad	Niños	Niños y adultos
% individuos colonizados	2-4 %	40-80 %
Septicemia	Habitual	Inusual

Infecciones sintomáticas	Infecciones agudas del tracto respiratorio superior	Meningitis Epiglotitis	Otitis media Sinusitis
	Infecciones agudas del tracto respiratorio inferior	Neumonía	Bronquitis Neumonía
	Otras infecciones agudas	Artritis Pericarditis Celulitis	Conjuntivitis
	Infecciones crónicas	No	Colonización del tracto respiratorio inferior en pacientes con enfermedades respiratorias subyacentes como EPOC, BC o FQ.

EPOC, enfermedad pulmonar obstructiva crónica; BC, bronquitis crónica; FQ, fibrosis quística

3.3. Variabilidad genética de *H. influenzae*

El tamaño del genoma de *H. influenzae* es aproximadamente 1,8 Mb. La cepa *H. influenzae* Rd KW20 (variante de una cepa capsulada serotipo d, carente de cápsula, no patógena) es la primera bacteria cuyo genoma completo fue secuenciado y en el que se anotaron 1.743 genes (Fleischmann *et al.*, 1995). Actualmente, se dispone del genoma completo de 13 cepas de *H. influenzae* (12 cepas no tipables y *H. influenzae* Rd (KW20)). Se ha observado que sólo el 50% de los genes están presentes en todas ellas (Hogg *et al.*, 2007). Asimismo, numerosos análisis de diversidad genética entre aislados de *H. influenzae* realizados mediante electroforesis en campo pulsado (PFGE, del inglés *pulse field gel electrophoresis*), ribotipado o tipado de secuencias multilocus, indican la existencia de una gran diversidad genética, mayor entre cepas no tipables (Erwin *et al.*, 2008; Fernaays *et al.*, 2006). La diversidad genética observada entre aislados de *H. influenzae* se debe a un conjunto de razones:

a) *H. influenzae* es una bacteria competente natural. Tiene la capacidad de captar ADN lineal del medio extracelular que puede recombinar e integrarse en su genoma. La competencia natural de *H. influenzae* se induce en ausencia de fuentes de carbono y energía, lo que provoca un aumento de los niveles de AMP cíclico citosólico (AMPc). El AMPc actúa como cofactor de la proteína Crp (del inglés *cAMP receptor protein*). Crp activa la transcripción del gen que codifica la proteína activadora de

competencia Sxy. Crp y Sxy activan conjuntamente la expresión de genes implicados en la captura de ADN, entre los que se encuentran los componentes del pili tipo IV, (Maughan & Redfield, 2009). *H. influenzae* no capta ADN exógeno de forma indiscriminada. El sistema de captación tiene afinidad por fragmentos de ADN que contienen una señal específica de captura o USS (del inglés *uptake specific signal*). En *H. influenzae*, esta señal es la secuencia 5'-AAGTGCGGT-3' (Maughan & Redfield, 2009). Además, *H. influenzae* posee sistemas de restricción-modificación de tipo III para la eliminación del ADN exógeno no deseado. Este sistema consiste en dos enzimas: una metiltransferasa que metila secuencias específicas del DNA propio de la bacteria y una endonucleasa que cataliza la escisión del DNA no metilado (Fox *et al.*, 2007).

b) *H. influenzae* incorpora ADN exógeno mediante HGT. La población colonizadora de *H. influenzae* en la nasofaringe y en el tracto respiratorio inferior es policlonal (Mukundan *et al.*, 2007; Murphy *et al.*, 1999) y existen fenómenos de transferencia génica horizontal *in situ* (Hiltke *et al.*, 2003).

c) *H. influenzae* presenta una frecuencia elevada de polimorfismos genéticos causados por mutaciones puntuales no sinónimas, inserciones, deleciones y duplicaciones génicas. Los polimorfismos se observan en genes que codifican proteínas localizadas en la superficie bacteriana, lo que contribuye a aumentar la variabilidad antigénica de este microorganismo (Duim *et al.*, 1994; Forbes *et al.*, 1992; Munson *et al.*, 1993; Weiser *et al.*, 1995).

d) La expresión de algunos genes de *H. influenzae* está regulada mediante variación de fase. La secuenciación del genoma de *H. influenzae* Rd KW20 reveló una alta frecuencia de repeticiones de secuencias cortas de ADN (Fleischmann *et al.*, 1995; Hood *et al.*, 1996). Estas secuencias oscilan entre 1 y 9 nucleótidos y se denominan repeticiones de secuencia simple o SSRs (del inglés *simple sequence repeats*). Las SSRs se encuentran en regiones promotoras o en pautas de lectura abierta de genes concretos. La SSR de un gen está conservada en secuencia y posición relativa. Sin embargo, el número de repeticiones de cada SSR de un determinado gen varía en función de la cepa. La introducción de cambios en el número de repeticiones de una SSR conlleva cambios en el marco traduccional de lectura (si la SSR está en la pauta abierta de lectura del gen) o cambios en el promotor, que determinarán variaciones en los niveles de expresión del gen correspondiente. Estos cambios son generados por errores de la ADN polimerasa durante la replicación del ADN que provocan un desapareamiento de hebras (Moxon *et al.*, 2006; Power *et al.*, 2009). La variación de fase es un mecanismo estocástico, reversible y de alta frecuencia, que facilita la supervivencia bacteriana frente a las fluctuaciones del

ambiente y es una estrategia utilizada por muchas bacterias adaptadas a un hospedador (Moxon *et al.*, 2006). En *H. influenzae*, un conjunto de genes con secuencias SSR está implicado en virulencia. Se ha descrito regulación por variación de fase en genes implicados en adquisición de hierro, síntesis del LPS y en genes que codifican proteínas de membrana externa que actúan como adhesinas. Asimismo, la metiltransferasa ModA1 del sistema de restricción-modificación de tipo III está sometida a este tipo de regulación. Dado que ModA controla la expresión de un repertorio de genes, este repertorio se llama regulón de fase variable o *phasevarion* (del inglés *phase variable regulon*) (Srikhanta *et al.*, 2005; Srikhanta *et al.*, 2010).

e) Se han descrito cepas de *H. influenzae* hipermutadoras asociadas a la persistencia bacteriana en el tracto respiratorio inferior de pacientes con fibrosis quística (Watson *et al.*, 2004). Estas cepas presentan defectos en el sistema de reparación de desapareamiento guiado por metilación o MMR (del inglés, *methyl-directed mismatch repair*) debido a mutaciones en el gen *mutS*.

3.4. Factores de virulencia y mecanismos de patogénesis de HiNT

A continuación, describimos un conjunto de factores de virulencia de HiNT y mecanismos de patogénesis asociados.

3.4.1. El lipooligosacárido de HiNT: estructura, diversidad e implicación en virulencia

La envoltura celular de las bacterias Gram negativas está compuesta por una membrana interna, un espacio periplásmico y una membrana externa. La membrana externa está constituida en su mayor parte por una bicapa lipídica que consta de fosfolípidos en su cara interna y moléculas de lipopolisacárido (LPS) en su cara externa (Kita & Nikaido, 1973).

El LPS bacteriano está formado por glicolípidos. Cada molécula de LPS está compuesta por lípido A, núcleo oligosacárido y cadena O. El lípido A sirve de anclaje de la molécula de LPS a la membrana externa y es su componente lipídico más importante. El núcleo polisacárido está unido al lípido A y se divide en núcleo interno y núcleo externo. El núcleo interno está formado por ácido 3-deoxi-D-mano-oct-2-ulosónico (Kdo) y heptosas. Los residuos Kdo están unidos al lípido A y presentan cargas negativas en el grupo carboxi. Las heptosas, que constituyen el sitio de unión

al núcleo externo, a menudo están modificadas con grupos fosfatos. El núcleo externo está compuesto por oligosacáridos de hexosas que sirven como anclaje para la cadena O, que es la región del LPS más expuesta al exterior. La cadena O es un polisacárido variable en longitud y tipo de azúcar, y contiene los determinantes antigénicos responsables de la especificidad serológica. La molécula de LPS de *H. influenzae* carece de cadena O, por lo que se denomina lipooligosacárido (LOS). Los genes implicados en la biosíntesis del LOS de *H. influenzae* están descritos en la **Tabla 3**. Una representación esquemática de la estructura de la molécula de LOS de *H. influenzae* se muestra en la **Figura 8**.

El lípido A de la molécula de LOS de *H. influenzae* (**Fig. 8a**) consiste en una diglucosamina a la que se unen los ácidos grasos. El análisis del lípido A en distintas cepas de *H. influenzae* revela heterogeneidad en longitud, número y posición de los ácidos grasos, si bien el patrón de acilación más frecuente es la hexa-acilación (Mikhail *et al.*, 2005). El gen *htrB* codifica una tetradecanoil transferasa que añade un ácido graso de 14 carbonos al lípido A (Lee *et al.*, 1995). El núcleo interno del LOS consta de una molécula fosforilada de Kdo unida a una triheptosa (Hep I- Hep II- Hep III). Los genes implicados en la síntesis del núcleo interno son *kdtA*, que codifica una Kdo transferasa que incorpora una molécula de Kdo al lípido A, y *kdkA*, responsable de la fosforilación del Kdo (**Fig. 8a**) (White *et al.*, 1997). La heptosiltransferasa que une la molécula de Kdo con la triheptosa mediante enlace con la Hep I está codificada por *opsX* (Gronow *et al.*, 2005). La transferencia de las Hep II y III está catalizada por las proteínas codificadas por *rfaF* y *orfH*, respectivamente (Hood *et al.*, 1996). *lgtF* es responsable de iniciar la extensión de oligosacáridos a partir de la Hep I, añadiendo una glucosa (Hood *et al.*, 2004a). El núcleo interno, con una glucosa en la Hep I, es la porción de LOS conservada en todas las cepas de *H. influenzae* analizadas (Schweda *et al.*, 2007).

El núcleo externo está formado a partir de los oligosacáridos que conforman las extensiones de la triheptosa (**Fig. 8b**) (Schweda *et al.*, 2007). Las enzimas encargadas de añadir las ramificaciones a las Hep II y III son codificadas por *lic2C* y *lpsA*, respectivamente. *lgtF* y *lpsA* están presentes en todas las cepas de *H. influenzae* analizadas; en cambio, la presencia de *lic2C* es variable entre cepas (Hood *et al.*, 2004a). *Lic2C* cataliza la adición de una glucosa a la posición 0-4 de la Hep II. *LpsA* puede transferir una glucosa o una galactosa en las posiciones 0-2 o 0-3 de la Hep III. La adición de un azúcar u otro y la posición del mismo dependen de la variante alélica de *lpsA* presente en cada cepa. Cada cepa produce una de las cuatro combinaciones posibles respecto al enlace de la primera hexosa a la hep III (Deadman *et al.*, 2006). *oafA*, cuya expresión está regulada por variación de fase, es responsable de la

incorporación de grupos O-acetilo a la Hep III. *lpt6* está implicado en la adición de PEtn a la Hep II (Schweda *et al.*, 2007).

Tabla 3: Genes que codifican proteínas implicadas en la biosíntesis de LOS de HiNT.

Gen	Enzima	SSR en pauta abierto de lectura (5'-3')
<i>htrB</i>	tetradecanoil transferasa	
<i>kdtA</i>	Kdo transferasa	
<i>kdkA</i>	Kdo quinasa	
<i>opsX</i>	heptosiltransferasa I	
<i>rfaF</i>	heptosiltransferasa II	
<i>orfH</i>	heptosiltransferasa III	
<i>lpt6</i>	fosfoetanolamina transferasa	
<i>lgtF</i>	glucosiltransferasa (UDP glucosa	
<i>lic2C</i>	glucosiltransferasa	
<i>lpsA</i>	glicosiltransferasa	
<i>oafA</i>	acetilasa	GCAA
<i>lgtC</i>	galactosiltransferasa	GACA
<i>lic2A</i>	galactosiltransferasa	CAAT
<i>lex2AB</i>	glicosiltransferasa	GCAA
<i>lic1A</i>	colina quinasa	CAAT
<i>lic1B</i>	transportador de colina	
<i>lic1C</i>	PCho pirofosforilasa	
<i>lic1D</i>	PCho transferasa	
<i>lic3A</i>	sialiltransferasa	CAAT
<i>lic3B</i>	sialiltransferasa	CAAT
<i>lsgB</i>	sialiltransferasa	
<i>siaA</i>	sialiltransferasa	
<i>siaB</i>	CMP-Neu5Ac sintetasa	
<i>lic2B</i>	glucosiltransferasa	
<i>losB1/losB2</i>	heptosiltransferasa (DD; DL)	
<i>losA</i>	glucosiltransferasa	CGAGCATA

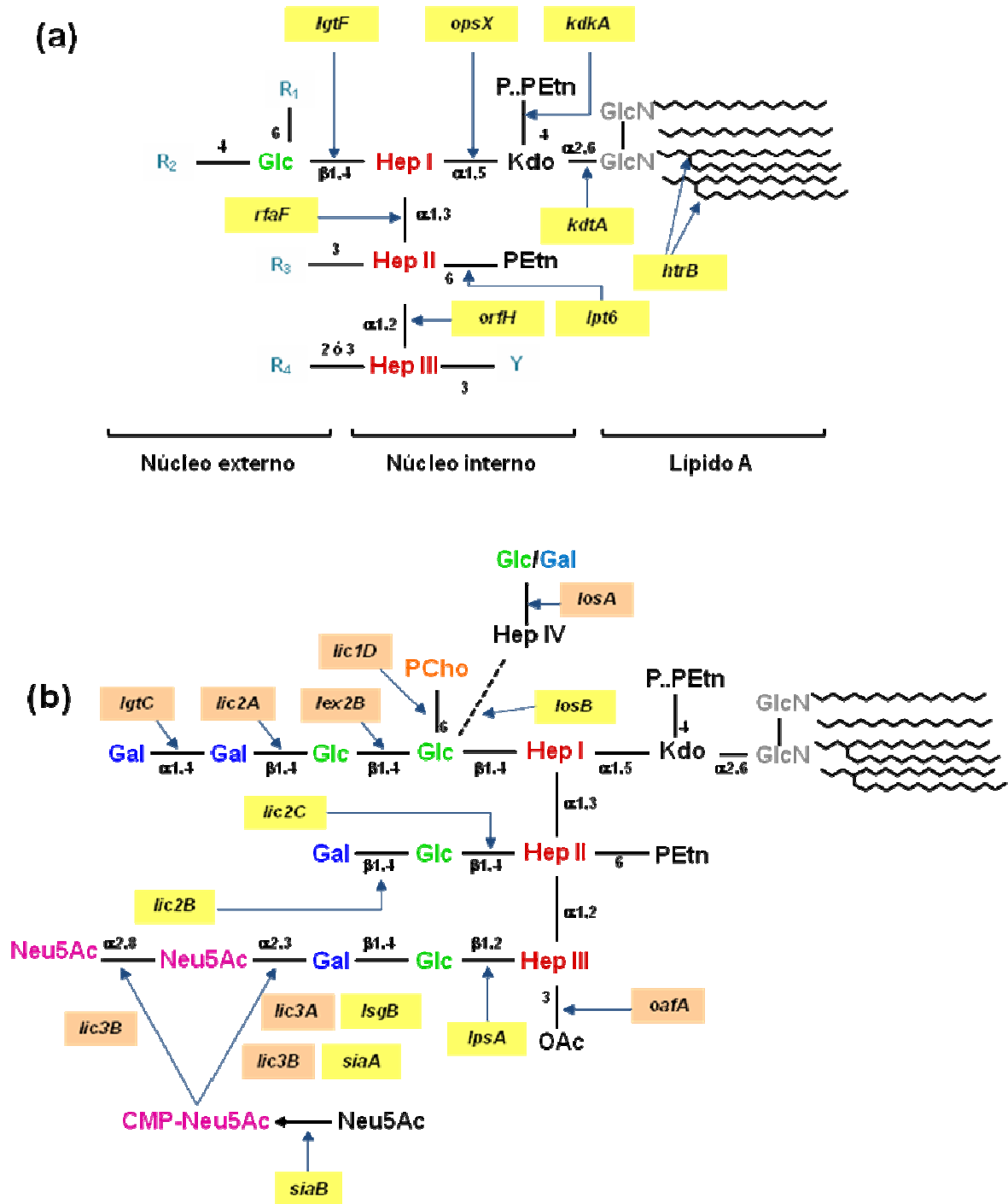


Figura 8: Estructura de la molécula de LOS de *H. influenzae*. (a) Estructura conservada en las moléculas de LOS de *H. influenzae*. El gen que codifica la proteína responsable de cada enlace está indicado con un recuadro amarillo. R1-R4 son las ramificaciones a nivel de núcleo externo. Y es la sustitución de la HepIII con un OAc o con PEtn. (b) Esquema de la estructura de una molécula modelo de LOS en *H. influenzae*. El gen que codifica la proteína responsable de cada enlace está indicado con un recuadro amarillo o naranja, en caso de que el gen presente regulación por variación de fase. Kdo, ketodeoxioctonato; Hep, heptosa; Gal, galactosa; Glu, glucosa; GlcN, glucosamina; PCho, fosforilcolina; PEtn, fosfoetanolamina; Neu5Ac, ácido N-acetilneuramínico o ácido siálico; OAc, grupo O-acetilo; P, fosfato.

El locus *lic2*, constituido por los genes *lic2A*, *ksgA*, *lic2C*, *lic2B* e *infA*, es el encargado de la extensión de la cadena oligosacárida a partir de la Hep II. El gen

lic2B codifica una glucosiltransferasa encargada de la unión de una glucosa/galactosa a la primera glucosa de la Hep II (Twelkmeyer *et al.*, 2011; Wong *et al.*, 2011). Existen cepas de HiNT que presentan en el núcleo externo del LOS oligosacáridos con una heptosa denominada Hep IV. *losAB* (*losA1/losB1* o *losA2/losB2*) codifican una glucosiltransferasa y una heptosiltransferasa, respectivamente (Hood *et al.*, 2010). La expresión de *losA* está regulada por variación de fase (Erwin *et al.*, 2006b). Los genes *losAB* se encuentran flanqueados por *infA* y *ksgA* en la misma región donde, alternativamente, se localiza *lic2BC*. Por tanto, la región genómica flanqueada por *infA* y *ksgA* en *H. influenzae* es variable entre cepas, de forma que puede estar vacía, contener *lic2BC* o contener *losAB* (Erwin *et al.*, 2005).

El operón *lic1ABCD* es responsable de la síntesis y transferencia de fosforilcolina (PCho) a la molécula de LOS de *H. influenzae*. *lic1A* codifica una quinasa de colina, *lic1B* codifica un transportador de colina, *lic1C* codifica una pirofosforilasa que activa PCho para su incorporación a la molécula de LOS, *lic1D* codifica una transferasa de PCho (**Fig. 8b**) (Weiser *et al.*, 1997). La expresión del operón está regulada por variación de fase. PCho se localiza en la molécula de LOS de la mayor parte de cepas analizadas unida a la primera glucosa de la HepI, en la posición R₁ (**Fig. 8a**), si bien se ha descrito la posible asociación de PCho a residuos de las extensiones Hep II y Hep III. La especificidad de *lic1D* respecto al aceptor de PCho está relacionada con polimorfismos en este gen (Lysenko *et al.*, 2000a; Schweda *et al.*, 2007). Además, *lic1D* puede estar duplicado en el genoma, resultando en la adición simultánea de dos moléculas de PCho en localizaciones distintas de la molécula de LOS (Fox *et al.*, 2008).

lic2A y *lgtC* son responsables de la adición de digalactosa a una glucosa de la molécula de LOS (Hood *et al.*, 1996; Weiser *et al.*, 1998). El resultado es la formación de una globotriosa, epítipo que mimetiza el antígeno P^K (Harvey *et al.*, 2001). Ambos genes presentan regulación por variación de fase (Power *et al.*, 2009; Weiser & Pan, 1998). *lex2B*, regulado por variación de fase, es responsable de la transferencia de la segunda hexosa en la ramificación Hep I. La adición de una glucosa o una galactosa depende de la variante alélica del gen *lex2B* presente en cada cepa (Deadman *et al.*, 2009). Si la molécula de digalactosa se une a la primera glucosa de la ramificación Hep I, la unión de la galactosa proximal es llevada a cabo por Lex2B.

La molécula de LOS de *H. influenzae* puede presentar ácido siálico en forma de Neu5Ac, ácido *N*-acetilneuramínico. Neu5Ac es un azúcar de nueve carbonos que el microorganismo capta del medio externo. SiaPQM es el transportador de Neu5Ac (Allen *et al.*, 2005; Severi *et al.*, 2005). En el citoplasma bacteriano, la molécula de Neu5Ac entra en una ruta catabólica o es procesada para su incorporación al LOS

(Severi *et al.*, 2007). Para ello, es necesaria la activación de Neu5Ac con CMP, proceso catalizado por la CMP-NeuAc sintetasa SiaB (Hood *et al.*, 1999b). La transferencia de CMP-NeuAc a una galactosa de la molécula de LOS es catalizada por las sialiltransferasas LsgB, SiaA, Lic3A o Lic3B (Fox *et al.*, 2006; Jones *et al.*, 2002). La presencia en el genoma de *H. influenzae* de los genes que codifican sialiltransferasas es variable entre cepas. *lic3B*, homólogo a *lic3A*, transfiere Neu5Ac a una galactosa o a otra molécula de Neu5Ac, generando ácido disiálico. *lic3A* y *lic3B* están regulados por variación de fase (Fox *et al.*, 2006).

La molécula de LOS de *H. influenzae* presenta variabilidad entre cepas y dentro de una misma cepa. Las moléculas de LOS de *H. influenzae* contienen glucosa, galactosa, ácido siálico, el aminoazúcar N-acetilglucosamina y las sustituciones de naturaleza no glucídica PCho, grupos acetilo y PEtn (Schweda *et al.*, 2007). La variabilidad del LOS entre cepas depende de (i) diferencias en el contenido génico, a nivel de presencia o ausencia de genes implicados en la biosíntesis de la molécula; (ii) variabilidad alélica de los genes implicados en dicha biosíntesis. La heterogeneidad del LOS dentro de una misma cepa se debe a la longitud variable de las cadenas de oligosacáridos unidas al núcleo interno. Este hecho puede ser debido a: (i) una biosíntesis incompleta durante la adición de azúcares (Hood *et al.*, 2001); (ii) la competencia entre distintas transferasas por un mismo aceptor, lo que puede generar glicoformas distintas en una cepa (Hood *et al.*, 1999a; Schweda *et al.*, 2007); (iii) la variación de fase de genes implicados en la biosíntesis. La regulación por variación de fase de varios genes implicados en la síntesis de LOS es un fenómeno combinatorio que genera múltiples posibilidades en el patrón de la molécula. Además, el apagado de algunas transferasas implica la pérdida de la glicoforma aceptora para otras transferasas, que no podrán incorporar ninguna sustitución a pesar de expresarse correctamente.

A modo de ejemplo, y debido a que la cepa HiNT375 ha sido empleada como cepa de referencia a lo largo de esta Tesis Doctoral, la **Figura 9** describe la estructura del LOS de este aislado clínico pediátrico (Bouchet *et al.*, 2003). HiNT375 presenta ramificaciones oligosacáridicas en las Hep I y III. No contiene los genes *lic2BC*, por lo que carece de ramificación en la Hep II. Presenta dos posibles glicoformas en la ramificación Hep III: Glu-Gal-Gal o Glu-Gal-Neu5Ac-Neu5Ac. Además, la molécula de LOS de HiNT375 presenta PCho en la primera glucosa de la ramificación Hep I (**Fig. 9**).

Varias modificaciones de la molécula de LOS de HiNT están relacionadas con distintos aspectos de la virulencia de este patógeno. La adición de grupos O-acetilo a la molécula de LOS de HiNT y la expresión de *losA* juegan un papel importante en la

resistencia del patógeno al ataque bactericida del suero (Fox *et al.*, 2005). La hexaacilación del lípido A confiere resistencia a los péptidos antimicrobianos (Starner *et al.*, 2002) y media la persistencia del patógeno durante la infección (DeMaria *et al.*, 1997; Swords *et al.*, 2002).

El papel de PCho en la virulencia de HiNT es multifactorial: (i) PCho facilita la formación de agregados bacterianos sobre superficies abióticas y sobre el oído medio, observado en un modelo *in vivo* de otitis media en chinchilla (Hong *et al.*, 2007a), favoreciendo la persistencia de HiNT durante la infección; (ii) PCho mimetiza estructuralmente la molécula eucariota factor activador de plaquetas (PAF, del inglés *platelet activating factor*) y se une al receptor de PAF (PAF-R) presente en la superficie celular, lo que facilita la adhesión e internalización bacteriana en células epiteliales bronquiales (Gould & Weiser, 2002; Swords *et al.*, 2000; Swords *et al.*, 2001); (iii) PCho media la resistencia de HiNT al ataque bactericida de los péptidos antimicrobianos (Lysenko *et al.*, 2000b); (iv) si bien juega un papel importante en los estadios iniciales de la infección por HiNT, PCho activa la vía clásica del complemento a través de su unión a la proteína de fase aguda CRP. Esta unión puede ser revertida por la presencia de surfactante pulmonar (Gould & Weiser, 2002). La regulación por variación de fase del operón *lic1ABCD* permite al patógeno el control de los niveles de expresión superficial de PCho para evadir la activación de la vía clásica del complemento tras las etapas iniciales de la infección (Pang *et al.*, 2008; Weiser & Pan, 1998; Weiser *et al.*, 1998). La unión a CRP ocurre cuando la molécula de PCho se encuentra en la Hep III de la molécula de LOS, pero no en la posición O6 de la primera glucosa de la ramificación Hep I (Lysenko *et al.*, 2000a). Por otra parte, PCho también parece permitir la evasión del ataque bactericida del suero mediado por anticuerpos al prevenir/limitar el acceso de los mismos a la superficie bacteriana (Clark *et al.*, 2012).

La sustitución de una glucosa con digalactosa lleva a la formación de una globotriosa (Gal-Gal-Glc), que mimetiza el antígeno P^k presente en la superficie de eritrocitos y de varios tipos de células epiteliales humanas (Harvey *et al.*, 2001). La presencia de digalactosa en el LOS de HiNT juega un papel en: (i) la resistencia del patógeno a la muerte mediada por activación de la vía clásica del complemento (Weiser & Pan, 1998). La digalactosa está relacionada con la inhibición de la deposición de C4b sobre la superficie bacteriana (Erwin *et al.*, 2006a; Ho *et al.*, 2007); (ii) la virulencia del patógeno. La expresión de dos residuos de galactosa aumenta la virulencia de HiNT (Griffin *et al.*, 2005).

La presencia de ácido siálico en la molécula de LOS de HiNT confiere resistencia al ataque bactericida del suero humano, impidiendo la deposición de C3 y C4 (Figueira *et al.*, 2007; Hood *et al.*, 1999b). Los glicoconjugados con ácido siálico

son componentes predominantes de la superficie de las células humanas, por lo que su presencia en la superficie bacteriana constituye un mecanismo de mimetismo molecular que contribuye a evadir el sistema inmune del huésped (Harvey *et al.*, 2001).

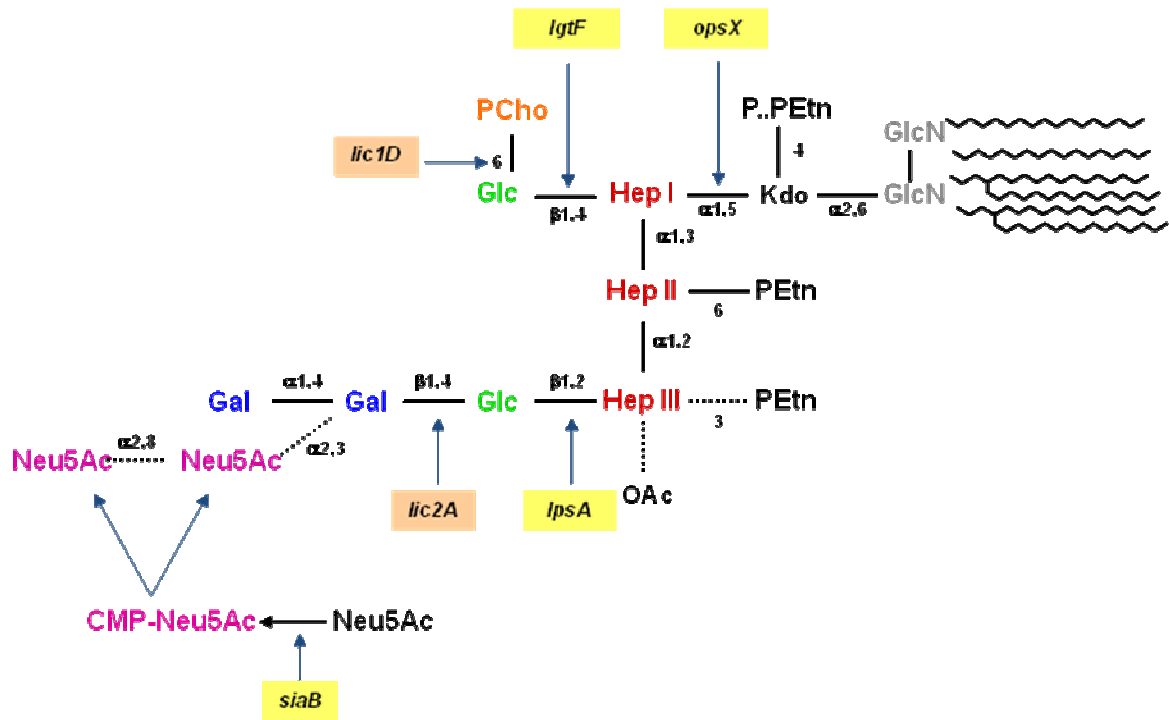


Figura 9. Estructura de la molécula de LOS de la cepa HiNT375. Los enlaces representados con una línea punteada corresponden a glicoformas alternativas. En la ramificación a partir de la Heptosa III, la glicoforma mayoritaria presenta una digalactosa terminal. La forma mayoritaria (enlaces punteados), presenta ácido siálico en su terminación (Hood y col., 1999). Kdo, ketodeoxioctonato; Hep, heptosa; Gal, galactosa; Glu, glucosa; GlcN, glucosamina; PCho, fosforilcolina; PEtn, fosfoetanolamina; NeuAc, ácido N-acetilneuramínico o ácido siálico; OAc, grupo O-acetilo; P, grupo fosfato.

3.4.2. Resistencia de HiNT a la muerte mediada por péptidos antimicrobianos

HiNT posee varios mecanismos de resistencia al ataque bactericida de los péptidos antimicrobianos (PAs): (i) la acilación del lípido A (Starner *et al.*, 2002); (ii) la presencia de PCho en la molécula de LOS (Lysenko *et al.*, 2000b); (iii) el operón *sapABCDZFZ*. Este operón codifica un transportador de membrana que confiere resistencia a PAs mediante la unión de SapA a los péptidos bactericidas en el espacio periplásmico. Una vez unidos a SapA, estos péptidos atraviesan la membrana

bacteriana a través del complejo Sap y son degradados en el citosol bacteriano por peptidasas citoplasmáticas (Mason *et al.*, 2006; Mason *et al.*, 2005; (Shelton *et al.*, 2011) Además, SapA se une a grupos hemo y es esencial para la utilización de este grupo por la bacteria en condiciones de escasez de hierro. Los PAs compiten y desplazan al grupo hemo en su unión a SapA, priorizando la resistencia a PAs sobre la captación de hierro (Mason *et al.*, 2011).

3.4.3. Formación de biopelículas por HiNT

Una biopelícula o *biofilm* es un ecosistema microbiano organizado, formado por uno o varios microorganismos asociados a una superficie biótica o abiótica, con características funcionales y estructurales complejas. Este tipo de conformación microbiana ocurre cuando las bacterias en fase planctónica se adhieren a una superficie o sustrato, formando una comunidad, que se caracteriza por la formación de una matriz extracelular adhesiva protectora (Costerton, 1995).

Se han propuesto 5 etapas para la formación de biopelículas (**Fig. 10**). En la primera y segunda etapa, las células planctónicas presentan una asociación leve y débil al sustrato seguida por una fuerte adhesión. La tercera y cuarta etapa se caracteriza por la agregación celular en microcolonias seguido por la maduración de la biopelícula. En la quinta y última etapa, las células que conforman la biopelícula se desprenden de la colonia y retornan a la vida planctónica transitoriamente y se dispersan.

La formación de biopelículas por HiNT ha sido objeto de gran controversia. En los últimos años ha habido un gran número de estudios que relacionan la formación de biopelículas por HiNT con infecciones persistentes. La Otitis Media (OM) es una enfermedad pediátrica que se produce por una disfunción del tubo de Eustaquio, dando como resultado la infección por patógenos oportunistas, como HiNT, que normalmente residen en la nasofaringe. Mientras que HiNT y otras bacterias son aisladas frecuentemente en pacientes con OM, las secreciones que se producen en la oreja no permiten el cultivo de bacterias viables. Sin embargo, algunos estudios muestran que HiNT y otras bacterias son detectadas en estas muestras mediante PCR (Bakaletz *et al.*, 1998; Post *et al.*, 1996). Análisis posteriores del tubo de Eustaquio de pacientes con OM crónica/recurrente y cortes de tejidos de orejas de chinchillas infectadas mostraron claramente comunidades de HiNT en forma de biopelículas (Hall-Stoodley *et al.*, 2006; Post, 2001). En el contexto de infecciones respiratorias asociadas con EPOC, en un estudio se mostró que HiNT expresa peroxiredoxina-glutaredoxina (*pgdX*) (Murphy *et al.*, 2005). En este estudio mostraron que los niveles

de PgdX incrementaron en las biopelículas de HiNT comparadas con los cultivos en fase planctónica, y que cuatro cepas de HiNT deficientes en *pgdX* mostraron una menor formación de biopelícula con respecto a la cepa silvestre (Murphy *et al.*, 2005). Esta evidencia sugiere la presencia de biopelículas de HiNT en pulmones de pacientes con EPOC. Además, el incremento de peroxiredoxina-glutaredoxina indica que HiNT está sometido a estrés oxidativo, lo cual es consistente con un estudio posterior en el que observaron que Dps, un factor de respuesta a estrés oxidativo, está implicado en la formación de biopelículas por HiNT (Pang *et al.*, 2012).

HiNT forma agregados extracelulares, sobre superficies bióticas como abióticas, con características de biopelícula (Armbruster *et al.*, 2009; Ehrlich *et al.*, 2002; Moxon *et al.*, 2008; Murphy & Sethi, 2002; Post, 2001). Los agregados de HiNT están relacionados con la persistencia del patógeno en el hospedador y con la resistencia a antibióticos (Moxon *et al.*, 2008). Estos agregados presentan una matriz extracelular en la que se ha identificado la presencia de ácido siálico, PCho, ADN de doble cadena, pili tipo IV y varias proteínas, incluyendo IgA1 proteasa, HMW1, HMW2 y Hap (Arce *et al.*, 2009; Goodman *et al.*, 2011; Hong *et al.*, 2007a; Jurgisek *et al.*, 2005; Jurgisek & Bakaletz, 2007; Webster *et al.*, 2006). La sialilación de la superficie bacteriana promueve la formación de biopelículas por HiNT en sistemas estáticos y en sistemas de flujo continuo (Greiner *et al.*, 2004; Swords *et al.*, 2004) y la persistencia *in vivo* en animales modelo de OM (Jurgisek *et al.*, 2005; Swords *et al.*, 2004). PCho favorece la infección y persistencia de HiNT al reducir la respuesta inflamatoria y promover la formación de biopelículas estables (Hong *et al.*, 2007b). HiNT también expresa pili tipo IV. Como en otras especies, el pili es esencial en la formación de biopelícula por HiNT (Carruthers *et al.*, 2012; Jurgisek *et al.*, 2007), y anticuerpos anti-pili tipo IV alteran la formación de biopelículas por HiNT (Novotny *et al.*, 2009). HiNT también produce DNA extracelular, el cual es importante en la formación de biopelícula (Jurgisek & Bakaletz, 2007). La proteína asociada a DNA nuclear DNABIII tiene un papel estructural importante al estabilizar el DNA extracelular en la matriz de la biopelícula de HiNT. Un trabajo reciente mostró que un anticuerpo anti-DNABIII altera la formación de biopelícula por HiNT (Goodman *et al.*, 2011). Este trabajo ofrece una nueva diana para una vacunación efectiva contra las biopelículas de HiNT y, posiblemente, de otros patógenos.

La formación de biopelículas por HiNT está regulada por la proteína LuxS, que interviene en la comunicación entre bacterias. LuxS es una molécula soluble que es liberada al medio y está implicada en la formación, maduración y dispersión de las biopelículas (Armbruster *et al.*, 2009). Este estudio sugiere que la inhibición efectiva de LuxS podría ser una posible diana terapéutica para el tratamiento de OM.

Durante este trabajo, se ha analizado la implicación del LOS de HiNT en la formación de biopelículas bacterianas sobre superficies abióticas.



Figura 10. Formación de una biopelícula bacteriana. Se han propuesto 5 etapas para la formación de biopelículas. En la primera y segunda etapa, las células planctónicas presentan una asociación leve y débil al sustrato seguida por una fuerte adhesión. La tercera y cuarta etapa se caracteriza por la agregación celular en microcolonias, seguida por la maduración de la biopelícula. En la quinta etapa, las células que conforman la biopelícula se liberan de la colonia, retornan a la vida planctónica transitoriamente y se dispersan.

3.5. Elementos bacterianos y dinámica de la infección epitelial por HiNT

A continuación, describimos las características de un conjunto de moléculas bacterianas que actúan a modo de adhesinas y resumimos las etapas asociadas a la infección del epitelio respiratorio por HiNT.

3.5.1. Moléculas implicadas en la interacción de HiNT con el epitelio respiratorio humano

HiNT presenta un conjunto de moléculas y estructuras de superficie que actúan a modo de adhesinas, a través de las cuales la bacteria interacciona con proteínas de

la matriz extracelular, con mucina y con la superficie de células del hospedador (**Tabla 4**). Las adhesinas de HiNT presentan variabilidad en base a: (i) su presencia o ausencia; (ii) polimorfismos que incluyen mutaciones puntuales, inserciones o deleciones; (iii) regulación de su expresión por variación de fase.

P2 es una proteína codificada por el gen *ompP2*, altamente inmunogénica y abundante en la membrana externa de HiNT. P2 se adhiere a la mucina, que es uno de los componentes principales del moco que cubre el epitelio respiratorio (Reddy *et al.*, 1996), y al receptor de laminina de células endoteliales (Orihuela *et al.*, 2009). P5 es una proteína codificada por el gen *ompP5*, altamente inmunogénica y abundante en la membrana externa de HiNT, que presenta homología con la proteína OmpA de *Escherichia coli*. P5 se une a la mucina (Miyamoto & Bakaletz, 1996; Reddy *et al.*, 1996) y a la superficie de las células epiteliales a través del receptor CEACAM-1 (Bookwalter *et al.*, 2008; Hill *et al.*, 2001; Virji *et al.*, 2000) y de la molécula ICAM-1 (del inglés *intercellular adhesion molecule-1*) (Avadhanula *et al.*, 2006).

La proteína OapA media la adhesión a células epiteliales a través de un receptor no identificado (Prasadarao *et al.*, 1999; Weiser *et al.*, 1995).

La proteína E (PE) es una proteína de membrana externa de HiNT altamente conservada, que media la adhesión bacteriana al epitelio respiratorio y a las proteínas de matriz extracelular laminina y vitronectina (Hallstrom *et al.*, 2009; Ronander *et al.*, 2008; Ronander *et al.*, 2009; Singh *et al.*, 2010). La unión de PE a vitronectina previene la deposición del complemento en la superficie bacteriana y, por tanto, la formación del complejo de ataque a la membrana (Singh *et al.*, 2011). Además, PE se une al plasminógeno humano como mecanismo de evasión de la inmunidad innata del hospedador (Barthel *et al.*, 2012).

H. influenzae posee dos proteínas autotransportadoras que actúan como adhesinas, Hap e Hia. Hap forma parte de un grupo de proteínas extracelulares conocidas como autotransportadores que se asocian a sí mismos (del inglés *self-associating autotransporters*, SAATs) (Henderson *et al.*, 2000). La expresión de *hap* está regulada por genes relacionados con la biosíntesis del LOS (Spahich *et al.*, 2012). Hap consta de una secuencia señal, un dominio barril β (Hap $_{\beta}$) y un dominio pasajero (Hap $_{\text{s}}$). Hap $_{\text{s}}$ se autoproteoliza, gracias a su actividad serin proteasa, liberándose al medio y dejando el dominio Hap $_{\beta}$ embebido en la membrana plasmática. Hap media la adhesión de HiNT a la superficie de células epiteliales y a las proteínas de matriz extracelular fibronectina, laminina y colágeno IV (Fink *et al.*, 2002; Hendrixson & St Geme, 1998). Asimismo, Hap promueve la formación de agregados bacterianos o microcolonias en la superficie celular (Hendrixson & St Geme, 1998; St Geme, 2002). La definición de la estructura cristalina de Hap $_{\text{s}}$ muestra que este dominio es

responsable de la oligomerización intercelular, entre subunidades de proteínas presentes en la superficie de bacterias distintas, lo que favorece la agregación inter-bacteria (Meng *et al.*, 2011). Hia (del inglés *Haemophilus influenzae adhesin*) media la adhesión bacteriana a células epiteliales a través de su dominio Hia_s (Barenkamp, 1996; Laarmann *et al.*, 2002).

HMW1A y HMW2A (del inglés *high-molecular-weight*) son glicoproteínas de alto peso molecular presentes en la membrana externa de *H. influenzae* (St Geme, 1993). Los genes *hmw1A* y *hmw2A* codifican las adhesinas HMW1A y HMW2A. Estos genes forman parte de los operones *hmw1ABC* y *hmw2ABC*, respectivamente (Hood *et al.*, 2004b; Masoud *et al.*, 2008). HMW1B y HMW2B forman dos dominios barril β que facilitan la translocación de HMW1A y HMW2A a través de la membrana, respectivamente.

HMW1C y HMW2C carecen de péptido señal N-terminal por lo que permanecen en el citoplasma y estabilizan a las proteínas HMW1A y HMW2A (Rao *et al.*, 1999). HMW1C es una glicosiltransferasa que transfiere un residuo hexosa a una asparagina de HMW1A (Grass *et al.*, 2010).

HiNT presenta un pili hemaglutinante o fímbria en su superficie, codificado por el operón *hifABCDE* (Gilsdorf *et al.*, 1997). Las fimbrias de *H. influenzae* son estructuras helicoidales con un diámetro de 5 nm y una longitud de 450 nm (St Geme *et al.*, 1996). Presentan disposición peritrica y promueven la unión del patógeno a mucina (Kubiet *et al.*, 2000) y a los tejidos nasofaríngeo y nasal (St Geme, 2002). HiNT también expresa pili tipo IV en su superficie, codificado por los operones *pilABCD* y *comABCDEF* (Bakaletz *et al.*, 2005). El pili tipo IV es un polímero filamentoso de 5-8 nm de diámetro formado por dos subunidades de pilina dispuestas de forma helicoidal. Esta estructura está implicada en la adhesión a células del epitelio respiratorio, formación de agregados bacterianos, colonización del tracto respiratorio superior (Jurcisek *et al.*, 2007; Pelicic, 2008), captura de ADN exógeno (Dougherty & Smith, 1999; Macfadyen, 2000) y motilidad por movimiento asociado a superficies (en inglés *twitching*) (Bakaletz *et al.*, 2005). La expresión de los operones *pilABCD* y *comABCDEF* es esencial para la funcionalidad del pili tipo IV, ya que mutantes en cada uno de los 10 genes que forman los dos operones muestran defectos en la adhesión de la bacteria a células primarias del epitelio bronquial, una disminución en

Tabla 4: Adhesinas de *H. influenzae*.

Adhesina	Gen	Función	Fuente variabilidad		
			Presencia variable	Polimorfismos	SSR

Introducción

			del gen		
P2	<i>ompP2</i>	Adhesión a mucina y a laminina	no	sí	no
P5	<i>ompP5</i>	Adhesión a mucina, a CEACAM-1 y a ICAM-1 en células epiteliales	no	sí	no
OapA	<i>oapA</i>	Adhesión a células epiteliales	no	sí	no
Proteína E	<i>pe</i>	Adhesión a vitronectina, laminina y a células epiteliales	no	no	no
Hap	<i>hap</i>	Adhesión a células epiteliales y a fibronectina, laminina y colágeno. Formación de microcolonias.	no	sí	no
Hia	<i>hia</i>	Adhesión a células epiteliales	sí	ND	no
HMW1	<i>hmw1ABC</i>	Adhesión a una glicoproteína sialilada no identificada en células epiteliales	sí	sí	En la región promotora
HMW2	<i>hmw2ABC</i>	Adhesión a células epiteliales	sí	sí	En la región promotora
Fimbria	<i>hifABCDE</i>	Adhesión a mucina y a tejidos nasofaríngeo y nasal	sí	ND	En la región promotora
Pili tipo IV	<i>pilABCD</i>	Adhesión a células epiteliales, formación de <i>biofilms</i> , captación de ADN	ND	ND	no
PCho	<i>lic1ABCD</i>	Adhesión a PAF-R	no	sí	En <i>lic1A</i>

su capacidad para formar biopelículas, y una disminución en la tasa de eventos de transformación natural (Carruthers *et al.*, 2012).

Como se ha descrito en el apartado 3.3 de la sección de Introducción, *H. influenzae* presenta una elevada tasa de variabilidad antigénica. Además de la variabilidad antigénica a nivel de la molécula de LOS, las adhesinas de HiNT son variables. Estudios de distribución génica muestran que aislados que poseen los operones *hmw* no poseen *hia*, y viceversa (St Geme *et al.*, 1998). *ompP2*, *hmw1A*, *hmw2A*, *oapA* y *ompP5* presentan variabilidad de secuencia entre cepas. Estas secuencias heterogeneas codifican regiones de la proteína expuestas al exterior. Esto sugiere que la presencia de polimorfismos en *ompP2* puede ser un mecanismo de evasión de la respuesta inmune del hospedador. La variabilidad de P2 puede contribuir

al desarrollo de nuevas respuestas inmunológicas durante cada exacerbación provocada por una cepa de nueva entrada con polimorfismos en P2 respecto a cepas adquiridas previamente (Thomas *et al.*, 2002). Las secuencias de *hmw1A* y *hmw2A* muestran un elevado nivel de identidad entre aislados (Barenkamp, 1992). Sin embargo, las regiones situadas en los promotores de *hmw1A* y *hmw2A* muestran un número variable del heptanucleótido SSR 5'-ATCTTTC entre cepas, o incluso entre cepas isogénicas aisladas del mismo individuo en momentos distintos (Dawid *et al.*, 1999; Giufre *et al.*, 2008). La variación de fase en la región promotora de ambos operones está asociada a cambios en la expresión de las adhesinas correspondientes. Así, un mayor número de repeticiones se asocia con una menor expresión proteica y viceversa (Cholon *et al.*, 2008; Dawid *et al.*, 1999). OapA es otra adhesina que ha mostrado variabilidad de secuencia entre cepas, que radica en la existencia de inserciones y repeticiones en tándem en el gen *oapA* (Prasadarao *et al.*, 1999). La variabilidad de *ompP5* radica en la existencia de sustituciones nucleotídicas no sinónimas (Duim *et al.*, 1997). P5 presenta varias regiones hipervariables cuya predicción estructural indica que quedan expuestas hacia el exterior de la bacteria. El número de regiones hipervariables varía entre tres y cinco según el tipo de modelización empleada (Duim *et al.*, 1997). La predicción de la estructura de P5 mediante el programa de predicción de barriles β transmembrana PRED-TMBB (<http://biophysics.biol.uoa.gr/PRED-TMBB/>) sugiere la presencia de diez dominios transmembrana y cinco regiones extracelulares (*loops*) con secuencias hipervariables (Mullins *et al.*, 2009).

3.5.2. Características de la interacción de HiNT con células respiratorias

Si bien HiNT ha sido considerado durante años un patógeno fundamentalmente extracelular, un conjunto de evidencias experimentales indican que HiNT es un patógeno intracelular facultativo. El modelo de infección del epitelio respiratorio humano por HiNT que consideramos actualmente presenta cuatro etapas: (i) adhesión bacteriana a la superficie celular, en un proceso mediado por un repertorio de adhesinas bacterianas y receptores eucariotas (evento tipo *zipper*); (ii) agregación bacteriana y formación de microcolonias, en un proceso mediado, al menos en parte, por Hap; (iii) invasión bacteriana; (iv) localización intracelular no proliferativa (**Fig. 11**). El empleo de líneas celulares en cultivo indica que HiNT invade células epiteliales bronquiales y alveolares, y células endoteliales (Ahren *et al.*, 2001; Ketterer *et al.*,

1999; St Geme & Falkow, 1990; St Geme, 2002; Swords *et al.*, 2001; Virji *et al.*, 1991). Por otra parte, estudios *ex vivo* han revelado la presencia de HiNT intracelular viable en tejido adenoide humano procedente de biopsias y en epitelio bronquial de pacientes EPOC (Bandi *et al.*, 2001; Forsgren *et al.*, 1994). Mediante trabajo realizado en nuestro laboratorio, hemos determinado que HiNT invade las células epiteliales respiratorias mediante un proceso dependiente del citoesqueleto de microtúbulos, las balsas lipídicas de la membrana plasmática eucariota y la cascada de señalización dependiente de PI3K. Tras su internalización, la vacuola que contiene HiNT adquiere transitoriamente marcadores de endosoma temprano y, en último término, el patógeno se localiza sin proliferar en un compartimento ácido con características de endosoma tardío (Morey *et al.*, 2011). La localización intracelular no proliferativa de HiNT puede estar asociada a la persistencia y recurrencia de la infección por este patógeno, a pesar del empleo de tratamiento antibiótico y desarrollo de anticuerpos neutralizantes. Durante esta Tesis Doctoral, hemos profundizado en los mecanismos moleculares implicados en la invasión epitelial por HiNT.

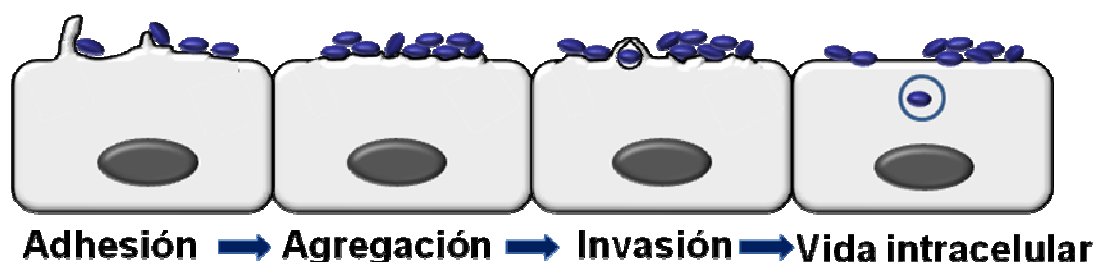


Figura 11. El modelo de infección del epitelio respiratorio humano por HiNT. Nuestro modelo actual de trabajo presenta cuatro etapas: (i) adhesión bacteriana a la superficie celular, en un proceso mediado por un repertorio de adhesinas bacterianas y receptores eucariotas; (ii) agregación bacteriana y formación de microcolonias, en un proceso mediado, al menos en parte, por Hap; (iii) invasión bacteriana; (iv) vida intracelular no proliferativa.

HIPÓTESIS Y OBJETIVOS

HiNT invade células del epitelio respiratorio y se aloja en un compartimento subcelular con características de endosoma tardío. La localización intracelular no proliferativa de *H. influenzae* puede condicionar la persistencia y recurrencia asociada a la infección por este patógeno, por lo que el análisis de las estrategias moleculares empleadas por HiNT para acceder al nicho intracelular puede facilitar la identificación de posibles dianas terapéuticas. En base a estas evidencias, formulamos la siguiente **hipótesis**: “HiNT es un patógeno intracelular facultativo que modula una panoplia de cascadas de transducción de señal en la célula hospedadora para invadir el epitelio respiratorio humano”.

El lipooligosacárido y las adhesinas de HiNT son moléculas expuestas en la superficie de la bacteria que presentan distribución, secuencia, estructura y niveles de expresión variables entre aislados clínicos. En base a estas evidencias, planteamos la siguiente **hipótesis**: “La variabilidad de las moléculas expuestas en la superficie de HiNT condiciona las características de la interacción del patógeno con elementos de la inmunidad innata del hospedador”.

Las **hipótesis** planteadas fueron abordadas mediante los siguientes **objetivos**:

1. Análisis de la contribución relativa de las sustituciones del lipooligosacárido de HiNT a fenotipos asociados a patogénesis mediante la caracterización de aislados clínicos de pacientes respiratorios crónicos y de cepas mutantes generadas en el laboratorio.
2. Determinación de la contribución de las balsas lipídicas, integrinas, quinasas, GTPasas, señalización dependiente de PI3K-Akt y [AMPc] a la infección del epitelio respiratorio humano por HiNT.
3. Análisis de la contribución relativa de las adhesinas PCho, P5 y Hap a la infección por HiNT mediante la caracterización de aislados clínicos de origen patológico diverso y de cepas mutantes generadas en el laboratorio.

Los **resultados** obtenidos a partir de los objetivos propuestos se presentan en dos **capítulos**:

Capítulo 1: Análisis de la contribución relativa de las modificaciones de la molécula de lipooligosacárido a fenotipos asociados a la patogénesis de HiNT.

Capítulo 2: Disección de los mecanismos de subversión celular y de la contribución relativa de adhesinas bacterianas durante la infección por el patógeno respiratorio HiNT.

MATERIAL Y MÉTODOS

1. CEPAS BACTERIANAS, MEDIOS Y CONDICIONES DE CULTIVO

Las cepas bacterianas usadas en este trabajo, así como sus características más relevantes, se describen en la **Tabla 1 (Anexo I)**.

Las cepas de *H. influenzae* se cultivaron en placas de Agar-chocolate (Biomérieux). Alternativamente, las cepas se cultivaron en placas de sBHI-Agar con hemina (10 µg/ml) y β-NAD (10 µg/ml). Los cultivos en medio líquido se realizaron en sBHI. En todos los casos, las bacterias se crecieron a 37°C en una atmósfera con 5% CO₂. Cuando fue necesario, las cepas se crecieron en medio en el que se añadió kanamicina 11 µg/ml o eritromicina 10 µg/ml.

Las cepas de *E. coli* se cultivaron en placas de Luria-Bertani (LB)-Agar a 37°C. Los cultivos líquidos se realizaron en LB. Cuando fue necesario, las cepas se crecieron en medio en el que se añadió kanamicina 50 µg/ml, ampicilina 50 µg/ml o eritromicina 150 µg/ml.

Todas las cepas se mantuvieron almacenadas a -80°C. Los *stocks* bacterianos se generaron a partir de la biomasa bacteriana de una placa fresca, que fue recogida, resuspendida en 1 ml de TSB-glicerol 10% y congelada a -80°C. En el caso de HiNT, las cepas a ensayar en los distintos tipos de experimentos fueron siempre reaisladas *de novo* de los *stocks* correspondientes, en ningún caso reaisladas a partir de placas previas.

2. INMUNODETECCIÓN DE PCho A PARTIR DE COLONIA (COLONY BLOT)

Los niveles de PCho presentes en la molécula de LOS de las cepas de HiNT se determinaron mediante inmunodetección a partir de colonia. La biomasa correspondiente a cada cepa, crecida en una placa de Agar-chocolate, se recogió con 1 ml de solución amortiguadora de fosfato salino (PBS, 145 mM NaCl; 7.7 mM NaHPO₄; 2.27 mM NaH₂PO₄; pH 7.2). Diluciones seriadas de la suspensión bacteriana generada se plaquearon en placas de sBHI-Agar. Las placas que contenían entre 100 y 300 colonias se utilizaron para transferir la biomasa bacteriana a una membrana de nitrocelulosa. La membrana se lavó dos veces durante 15 min/lavado en tampón TSBB (0.5 M NaCl, 0.5% Tween-20, 10 mM Tris-HCl, pH 8.0) y se incubó durante 16 h a 4°C con el anticuerpo monoclonal ratón anti-PCho TEPC-15 (Sigma) diluido 1:10000 en TSBB. A continuación, las membranas fueron sometidas a cinco lavados consecutivos de 5 min/lavado con TSBB e incubadas durante 16 h en TSBB con un anticuerpo policlonal cabra anti-ratón conjugado con fosfatasa alcalina (Caltag) diluido 1:10000. Finalmente, las membranas se lavaron cinco veces con TSBB, se incubaron en tampón AP (100 mM NaCl, 5 mM MgCl₂, 100 mM Tris-HCl, pH 9.5) y se revelaron con

5-bromo-4-cloro-3-indolfosfato (BCIP, Sigma) y nitroazul de tetrazolio (NBT, Sigma) disueltos en tampón AP. Tras varios minutos (entre 1 y 5), las colonias que expresan PCho en la molécula de LOS y que, por tanto, reaccionaron con el anticuerpo TEPC-15, generaron una señal morada. La reacción se paró añadiendo 10 ml de agua d.o.i.

3. EXTRACCIÓN, RESTRICCIÓN Y MODIFICACIÓN DE ADN

La extracción de ADN genómico bacteriano se realizó siguiendo el método descrito por Sambrook & Russell (2001). Brevemente, 1.5 ml de un cultivo de bacterias crecidas en fase estacionaria fue centrifugado. El *pellet* se resuspendió en 567 µl de tampón TE (10 mM Tris-HCl, pH 8.0; 1 mM EDTA) y se trató con SDS (100 µg/ml) y proteinasa K (0.5% p/v) durante 1 h a 37°C para lisar las bacterias. A continuación, se añadieron 100 µl de NaCl 5 M, la preparación se agitó, y se añadieron 80 µl de solución CTAB 10%-NaCl 0.7 M. Los lisados se incubaron 10 min a 65°C. Seguidamente, se procedió a la purificación del ADN mediante dos pasos sucesivos e idénticos de separación con fenol/cloroformo/alcohol isoamílico (25:24:1). En cada paso, se añadieron 750 µl de fenol/cloroformo/alcohol isoamílico a la muestra que se agitó y se centrifugó 5 min a 14.000 x g para separar la fase acuosa dónde se encuentra el ADN (superior) de la fase fenólica (inferior). Finalmente, la fase acuosa se pasó a un nuevo tubo y se añadieron 300 µl de isopropanol (aprox. 0.6 volúmenes) para precipitar el ADN. El tubo se centrifugó 5 min a 14.000 x g y el *pellet* de ADN se lavó con etanol 70% para eliminar sales residuales. Tras una última centrifugación (5 min a 14.000 x g), el *pellet* de ADN se resuspendió con 50 µl de agua d.o.i.

El ADN plasmídico fue extraído de las bacterias correspondientes y purificado usando los kits comerciales *QIAprep Spin Miniprep Kit* (Qiagen) y *Qiagen Plasmid Midi Kit* (Qiagen). El ADN plasmídico utilizado en experimentos de transfección transitoria de células eucariotas fue purificado mediante el kit comercial *Qiagen Endofree plasmid Maxi Kit* (Qiagen).

Para la purificación de ADN, en solución o a partir de geles de agarosa, se usaron los kits comerciales *Illustra GFX PCR DNA, Gel Band Purification Kit* (GE Healthcare) y *NucleoSpin Extract II* (Macherey-Nagel).

Las enzimas de restricción de ADN (Promega y New England Biolabs), y las enzimas de modificación de ADN T4 ADN ligasa y T4 quinasa (New England Biolabs), fueron empleadas siguiendo las indicaciones del fabricante.

4. REACCIÓN DE LA POLIMERASA EN CADENA (PCR)

Las reacciones de PCR se llevaron a cabo para amplificar fragmentos específicos de ADN. Para ello, se emplearon las enzimas polimerasa *GoTaq Flexi* ADN (Taq, Promega) o Biotools DNA Polymerase (Biotools). La enzima ADN polimerasa *Vent* (New England Biolabs) se utilizó cuando fue necesario obtener una mayor fidelidad de amplificación y/o fragmentos de ADN con extremos romos. Los cebadores usados en este trabajo se describen en la **Tabla 2 (Anexo I)**. Las reacciones de PCR con polimerasa Taq se realizaron en un volumen final de 50 µl, tal y como sigue: 1x tampón de reacción (proporcionado por el fabricante), 0.5 mM dNTPs, 20 pmoles de cada cebador, 2 mM MgSO₄, 1.25 U de ADN polimerasa y ADN molde. Las condiciones de reacción fueron las siguientes: (i) desnaturalización inicial (5 min a 95°C); (ii) 30 ciclos de desnaturalización (1 min a 95°C), anillamiento (1 min, la temperatura se puso a punto para cada pareja de cebadores) y elongación (1 min por kb del fragmento a amplificar, 72°C); (iii) elongación final (10 min a 72°C). Las reacciones de PCR con polimerasa *Vent* se realizaron en un volumen final de 50 µl siguiendo las siguientes condiciones: 1x tampón de reacción (proporcionado por el fabricante, contiene 2 mM MgSO₄), 0.5 mM dNTPs, 20 pmoles de cada cebador, 1.25 U de ADN polimerasa y ADN molde. Las condiciones de reacción fueron las siguientes: (i) desnaturalización inicial (5 min a 95°C); (ii) 30 ciclos de desnaturalización (1 min a 95°C), anillamiento (1 min, la temperatura se puso a punto para cada pareja de cebadores) y elongación (1 min por kb del fragmento a amplificar, 74°C); (iii) elongación final (10 min a 74°C). Estas condiciones fueron usadas en todas las reacciones de PCR realizadas con polimerasa *Vent* excepto para las reacciones de PCR inversa, que se llevaron a cabo para generar un fragmento de ADN lineal con extremos romos a partir de ADN plasmídico. Las reacciones de PCR inversa se realizaron en un volumen final de 50 µl, tal y como sigue: 1x tampón de reacción (proporcionado por el fabricante, contiene 2 mM MgSO₄), 0.5 mM dNTPs, 25 pmoles de cada cebador, 0.5 U de ADN polimerasa y 100 ng de ADN molde. Las condiciones para la reacción fueron las siguientes: (i) desnaturalización inicial (5 min a 92°C); (ii) 15 ciclos de desnaturalización (30 s a 92°C), anillamiento (30 s, la temperatura se puso a punto para cada pareja de cebadores) y elongación (1 min por kb del fragmento a amplificar, 74°C); (iii) elongación final (10 min a 74°C).

5. TRANSFORMACIÓN QUÍMICA DE *E. coli*

Este método se utilizó para generar cepas de *E. coli* competentes para su transformación con ADN plasmídico. Para ello, 2 ml de un cultivo de *E. coli* en fase estacionaria en medio LB se inoculó en 200 ml de LB. Este cultivo se incubó a 37°C con agitación (180 r.p.m.) hasta alcanzar una $DO_{600nm}=0.5$. Las bacterias se incubaron en hielo durante 10 min antes de ser recogidas mediante centrifugación (7.000 r.p.m., 10 min, 4°C). El *pellet* se resuspendió en 1/5 del volumen del cultivo inicial con Solución I (10 mM NaAc pH 5.6-6.0, 50 mM $MnCl_2$, 5 mM NaCl). Las bacterias se incubaron en hielo durante 10 min antes de ser recogidas mediante centrifugación (7000 r.p.m., 10 min, 4°C). El *pellet* se resuspendió en 1/5 del volumen del cultivo inicial con Solución II (10 mM NaAc pH 5.6-6.0, glicerol 5%, 70 mM $CaCl_2$, 5 mM $MnCl_2$). Las bacterias se incubaron en hielo durante 10 min antes de ser distribuidas en alícuotas de 80 μ l y se congelaron inmediatamente a -80°C.

Las bacterias competentes se transformaron con ADN plasmídico. Para ello, una alícuota de bacterias competentes se descongeló en hielo y se añadió el ADN de interés. La mezcla se incubó en hielo durante 30 min y, a continuación, fue sometida a un choque térmico de 90 s a 42°C en un baño termostático. Seguidamente, la mezcla se mantuvo en hielo durante 2 min y se añadieron 800 μ l de medio LB previamente atemperado a 37°C. La mezcla se incubó a 37°C durante 90 min en agitación (180 r.p.m.) y se plaqueó en LB-Agar con los antibióticos adecuados para seleccionar colonias transformadas con el ADN plasmídico de interés.

6. TRANSFORMACIÓN DE *H. influenzae* MEDIANTE INDUCCIÓN DE LA COMPETENCIA NATURAL (MÉTODO M-IV)

Este método se utilizó para la transformación de *H. influenzae* con ADN lineal. La competencia natural en *H. influenzae* se desarrolló en medio M-IV (Herriott *et al.*, 1970). El medio M-IV, cuya preparación está detallada en la **Tabla 5**, es un medio en el que no se produce crecimiento bacteriano y que se prepara fresco para cada transformación a partir de las soluciones 21, 22, 23, 24 y 40.

En detalle, la cepa de interés se reisló a partir del *stock* almacenado a -80°C en una placa de Agar-chocolate y se creció durante 12 h a 37°C con 5% CO_2 . A partir de esta placa, 1-2 colonias fueron inoculadas en un matraz estéril de 100 ml con 20 ml de sBHI, que se cultivó durante 12 h a 37°C con 5% CO_2 en agitación (180 r.p.m.). 50 μ l de este cultivo en fase estacionaria fueron inoculados en 35 ml de sBHI atemperado en un matraz estéril de 500 ml. El cultivo se creció a 37°C con 5% CO_2 en agitación

(180 r.p.m.). Cuando el cultivo alcanzó una $DO_{650nm}=0.2-0.3$, las bacterias se recogieron mediante centrifugación (6.000 x g, 4 min, TA). El *pellet* se lavó con 20 ml de medio M-IV a TA. La suspensión bacteriana se centrifugó (6.000 x g, 4 min, TA) y el *pellet* se resuspendió en 35 ml de M-IV a TA. La suspensión bacteriana se transfirió a un matraz estéril de 500 ml que se agitó a 100 r.p.m. y 37°C, con 5% CO₂ durante 100 min. En este momento, la mayor parte del cultivo bacteriano ha desarrollado competencia natural que se mantendrá al menos durante 1 h. La suspensión bacteriana se distribuyó en alícuotas de 1 ml a las que añadieron 176 µl de glicerol 100% por alícuota (15% v/v) y se congelaron inmediatamente a -80°C.

Para transformar las bacterias competentes, se descongeló una alícuota en frío, se centrifugó y el *pellet* se resuspendió en 1 ml de M-IV fresco. Se añadió al menos 1 µg del ADN lineal de interés y la mezcla bacterias-ADN se incubó durante 30 min a 37°C y 180 r.p.m. Se añadieron 5 ml de medio sBHI y la suspensión bacteriana se incubó a 37°C y 180 r.p.m durante 2 h. Transcurridas las 2 h, se plaquearon 100 µl de la suspensión o, alternativamente, ésta se centrifugó (14.000 x g, 1 min), el *pellet* se resuspendió en 100 µl de PBS y se plaqueó en sBHI-Agar. Las bacterias que integraron el ADN exógeno en su genoma mediante un evento de doble recombinación homóloga crecieron formando colonias que fueron seleccionadas en sBHI-Agar con los antibióticos adecuados.

7. GENERACIÓN DE PLÁSMIDOS Y ESTIRPES BACTERIANAS

La estrategia seguida para la generación de las estirpes mutantes de HiNT se detalla en la **Figura 12**.

Los genes *lic1BC* (HI1538 y HI1539), *hap* (HI0354), *ompP5* (HI1332), y sus respectivas regiones adyacentes, se amplificaron a partir de ADN genómico purificado de la cepa HiNT375. Las amplificaciones se realizaron con polimerasa Taq y las parejas de cebadores *lic1BC*-F1/*lic1BC*-R1, *hap*-F1/*hap*-R1 y *ompP5*-F1/*ompP5*-R1, respectivamente. Los cebadores fueron diseñados a partir del genoma secuenciado de la cepa *H. influenzae* Rd (KW20) (<http://cmr.jcvi.org/cgi-bin/CMR/GenomePage>). Los fragmentos de ADN obtenidos, de 2.0, 2.2 y 2.1 kb respectivamente, se clonaron en pGEM-T Easy (Promega), generando los plásmidos pGEM-T/*lic1BC*, pGEM-T/*hap* y pGEM-T/*ompP5*, respectivamente. La información detallada acerca de los plásmidos generados y empleados en este trabajo está descrita en la **Tabla 3 (Anexo I)**. Estos plásmidos se utilizaron como molde en reacciones de PCR inversa con polimerasa *Vent* y las parejas de cebadores *lic1BC*-F2/*lic1BC*-R2, *hap*-F2/*hap*-R2 y *ompP5*-F2/*ompP5*-R2, respectivamente. Estas

amplificaciones generaron una delección de aproximadamente 30 pb en la región central de cada gen. Los productos de PCR inversa se utilizaron como vectores en los que se clonó un fragmento de ADN de 1.1 kb que contiene el gen *ermC*. *ermC* confiere resistencia a eritromicina y fue obtenido mediante digestión con *Sma*I a partir del plásmido pBSLerm. Así, se generaron los plásmidos pAL-1, pAL-2 y pAL-3, que contienen casetes de disrupción para los genes *lic1BC*, *hap* y *ompP5*, respectivamente. Estos plásmidos fueron digeridos con *Not*I para obtener fragmentos de ADN lineal de 3.1, 3.3 y 3.2 kb, respectivamente. Los casetes de disrupción se utilizaron para transformar individualmente la cepa HiNT375 mediante el método M-IV.

La generación de cepas mutantes se llevó a cabo mediante eventos de doble recombinación homóloga en las regiones flanqueantes de cada gen de interés, que fueron sustituidas por el casete de disrupción correspondiente. Los eventos de doble recombinación homóloga fueron seleccionados mediante plaqueo en sBHI-Agar con eritromicina (10 µg/ml). Se generaron las cepas HiNT375Δ*lic1BC*, HiNT375Δ*hap* y HiNT375Δ*ompP5*. Las cepas HiNT375Δ*hap*Δ*ompP5* y HiNT375Δ*hap*Δ*lic1BC* se generaron mediante dos eventos sucesivos de doble recombinación homóloga. El primer evento de recombinación se realizó sobre la cepa HiNT375 silvestre, y generó la cepa HiNT375Δ*hap*. El segundo evento de recombinación se llevó a cabo sobre la cepa HiNT375Δ*hap* con los casetes de disrupción Δ*ompP5*::*km^r* y Δ*lic1BC*::*km^r*, respectivamente. Para generar estos casetes, los vectores procedentes de la PCR inversa de pGEM-T/*ompP5* y pGEM-T/*lic1BC* se utilizaron para clonar un fragmento como de ADN que contiene un casete de resistencia a Km (*Km^r*). Este fragmento se obtuvo mediante digestión con *Hinc*II a partir del plásmido pUC4K (GE Healthcare). Así, se generaron los plásmidos pAL-4 y pAL-5, que contienen casetes de disrupción para los genes *ompP5* y *lic1BC*, respectivamente. Estos plásmidos fueron digeridos con *Not*I, generando fragmentos lineales de 3.4 y 3.3 kb, respectivamente. Los casetes de disrupción Δ*ompP5*::*km^r* y Δ*lic1BC*::*km^r* se introdujeron individualmente en la cepa HiNT375Δ*hap* mediante el método M-IV. Los eventos de doble recombinación se seleccionaron mediante plaqueo en sBHI-Agar con eritromicina (10 µg/ml) y kanamicina (11 µg/ml). Se generaron las cepas HiNT375Δ*hap*Δ*ompP5* y HiNT375Δ*hap*Δ*lic1BC*. En todos los casos, las disrupciones se comprobaron mediante PCR con cebadores adecuados.

Tabla 5: Preparación del medio M-IV.

Solución 21 (S21, pH = 7.4)		Concentración
Ácido L-Aspártico		4,0 mg/ml
Ácido L-Glutámico		0,2 mg/ml
Ácido Fumárico		1,0 mg/ml
NaCl		4,7 mg/ml
Tween 80		0,02 % (v/v)
K ₂ HPO ₄		0,87 mg/ml
KH ₂ PO ₄		0,67 mg/ml
Solución autoclavada		
Solución 22 (S22)		Protocolo para 100 ml
L – Cisteína		0,4 g
L – Tirosina		0,1 g
Se disolvieron en 10 ml de 1N HCl a 37°C. A continuación se enrasó a 100 ml con agua destilada y se añadió:		
L – Citrulina		0,06 g
L – Fenilalanina		0,2 g
L – Serina		0,3 g
L – Alanina		2 mg/ml
Solución esterilizada por filtración		
Solución 23 (S23)		Concentración
CaCl ₂		0,1 M
Solución autoclavada		
Solución 24 (S24)		Concentración
MgSO ₄		0,1 M
Solución autoclavada		
Solución 40 (S40)		Concentración
Casaminoácidos libres de vitamina		5% (p/v)
Solución esterilizada por filtración		
Preparación de M-IV:		
Se mezclan las soluciones S21, S22, S23, S24 y S40 en una proporción de 100:1:1:1:1, respectivamente.		

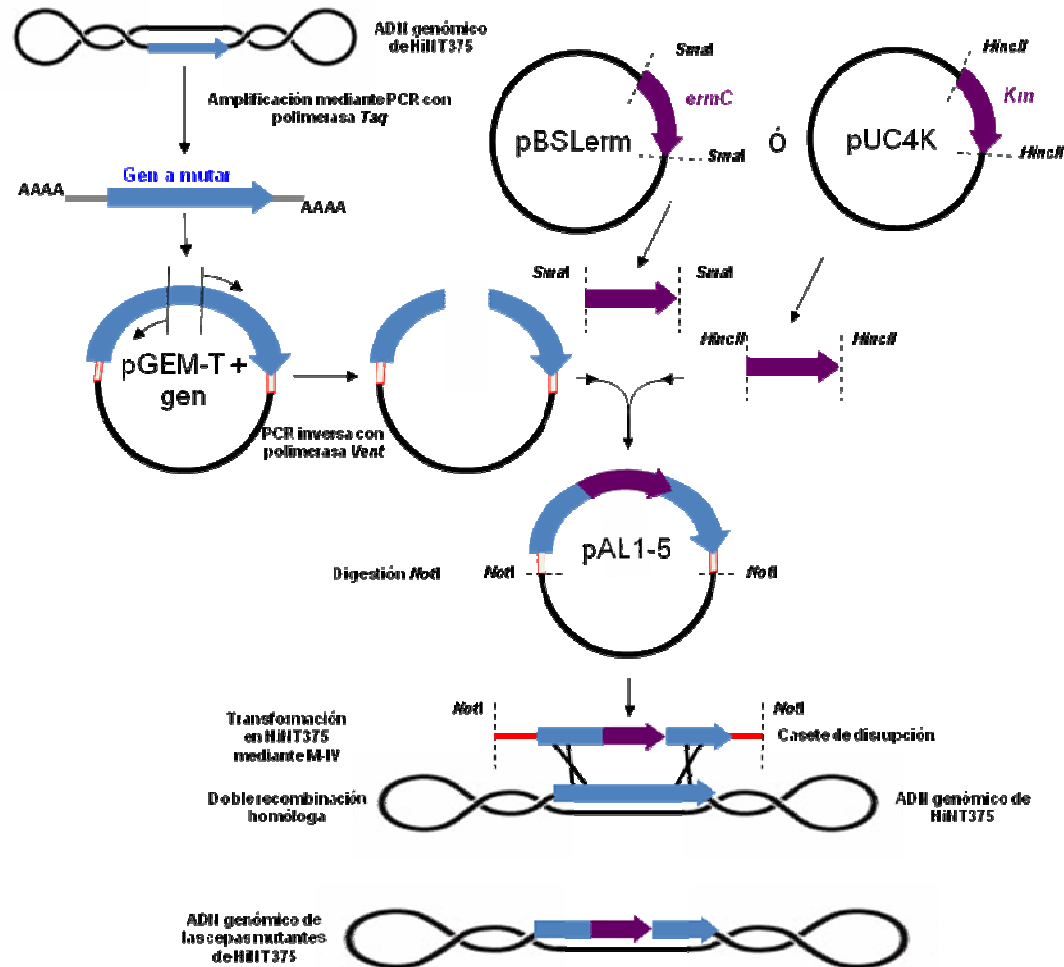


Figura 12. Generación de estirpes mutantes de HiNT. Los plásmidos pAL-1 a pAL-5 contienen los casetes de disrupción $\Delta hap::ermC'$, $\Delta ompP5::ermC'$ y $\Delta lic1BC::ermC'$, $\Delta ompP5::kmr$ y $\Delta lic1BC::kmr$, respectivamente. Estos plásmidos son la fuente de fragmentos de ADN lineal que se transformaron mediante transformación natural e integraron en el cromosoma de HiNT375 mediante doble recombinación homóloga para generar las estirpes mutantes correspondientes.

8. DETERMINACIÓN DE LA FORMACIÓN DE BIOPELÍCULAS POR HiNT MEDIANTE FLUJO CONTINUO

Para analizar la formación de biopelículas bajo flujo continuo, se usó un dispositivo de vidrio de 60 ml denominado microfermentador (*Pasteur Institute's Laboratory of fermentation*), con un flujo continuo de 40 ml/h de sBHI en constante aireación con aire estéril a presión 0.3 bar. Los microfermentadores contienen espátulas que sirven como soporte abiótico para el crecimiento bacteriano. La cepa de interés se aisló del stock almacenado a -80°C en una placa de Agar-chocolate y se

creció durante 12 h a 37°C con 5% CO₂. A partir de esta placa, se inocularon 3-4 colonias en un matraz estéril de 100 ml con 20 ml de sBHI atemperado, que se incubó a 37°C, 5% CO₂ y 180 r.p.m. hasta alcanzar una DO_{600nm}=1.0, ~2x10⁸ bacterias/ml. 500 µl de este cultivo fueron inoculados en cada microfermentador. Los microfermentadores fueron incubados durante 16 h a 37°C con el flujo y aireación descritos anteriormente. Tras este tiempo, se desmontó el dispositivo y se analizó la formación de biopelícula sobre la espátula y las paredes del microfermentador. Las biopelículas formadas en la espátula fueron fotografiadas con una cámara digital Nikon Coolpix 950. A continuación, las biopelículas fueron resuspendidas en un tubo tipo Falcon con 10 ml de PBS. La turbidez de la suspensión bacteriana se analizó a DO_{600nm}. Cada cepa bacteriana fue analizada utilizando este procedimiento por duplicado en al menos tres experimentos independientes (n≥6).

9. DETERMINACIÓN DE LA RESISTENCIA DE HiNT A PÉPTIDOS ANTIMICROBIANOS

Cada cepa de interés se reisoló del *stock* almacenado a -80°C en una placa de Agar-chocolate y se creció durante 12 h a 37°C con 5% CO₂. A partir de esta placa, 10 colonias fueron inoculadas en un matraz estéril de 100 ml con 10 ml de sBHI, que se cultivó a 37°C, 5% CO₂ y 180 r.p.m. hasta alcanzar una DO_{650nm}=0.3. Una vez alcanzada la fase exponencial, el cultivo se centrifugó (3.500 r.p.m., 20 min, TA), el *pellet* resultante se lavó con 10 ml de PBS, y se centrifugó de nuevo. El *pellet* fue resuspendido en el remanente de PBS. Esta suspensión bacteriana se ajustó a una DO_{650nm}=0.15, ~10⁸ u.f.c./ml. La suspensión bacteriana se empleó para realizar diluciones seriadas en PBS (900 µl PBS + 100 µl dilución anterior) hasta la dilución 10⁻². A continuación se realizó una última dilución en LTM (del inglés Liquid Testing Medium) (100 µl TSB; 1ml 100 mM PBS; 200 µl 5 M NaCl y 8.7 ml agua desionizada) con 900 µl LTM + 100 µl dilución 10⁻² (dilución 10⁻³ en LTM). En paralelo, se realizaron diluciones del péptido antimicrobiano de elección en LTM (polimixina B o β-defensina 1, [*stocks*]= 100 µg/ml en agua). Las concentraciones finales de péptido empleadas fueron: (i) 1; 0.75; 0.5; 0.25 y 0.125 µg/ml, en el caso de la polimixina B; (ii) 1; 0.75 y 0.5 µg/ml, en el caso de la β-defensina 1. A continuación, se mezclaron 25 µl de cada dilución de péptido con 5 µl de la suspensión bacteriana en LTM de cada cepa en estudio. La mezcla bacteria-péptido se incubó a 37°C durante 30 min ó durante 1 h, según el experimento. El volumen completo (30 µl) se plaqueó en sBHI-Agar. Las bacterias se enumeraron mediante recuento de u.f.c. Los resultados se muestran en %

de supervivencia, comparando el recuento de u.f.c. de las bacterias incubadas con cada concentración de péptido con el recuento control, obtenido para cada cepa en ausencia de péptido. Cada cepa bacteriana fue analizada utilizando este procedimiento por duplicado en al menos tres experimentos independientes ($n \geq 6$).

10. ENSAYO DE AGREGACIÓN BACTERIANA

Cada cepa de interés se reaisló del *stock* almacenado a -80°C en una placa de Agar-chocolate y se creció durante 12 h a 37°C con 5% CO_2 . A partir de esta placa, se inocularon 2-3 colonias en un matraz estéril de 100 ml con 20 ml de sBHI atemperado (LB atemperado en el caso de *E. coli*), que se incubó a 37°C , 5% CO_2 con agitación 180 r.p.m. durante 12 h. La densidad óptica de los cultivos se ajustó con PBS, para obtener 20 ml de suspensión bacteriana a $\text{DO}_{600\text{nm}}=1$ en un tubo tipo Falcon. Esta suspensión bacteriana determina el comienzo del experimento ($t=0$). Los tubos se mantuvieron estáticos a TA durante 7 h. Cada h ($t=1$ a $t=7$ h), se tomó 1 ml de suspensión bacteriana de la parte superior del tubo sin perturbar la columna y se cuantificó la $\text{DO}_{600\text{nm}}$. El descenso progresivo de la $\text{DO}_{600\text{nm}}$ fue asociado con la agregación bacteriana. Cada cepa fue analizada utilizando este procedimiento en al menos cuatro experimentos independientes ($n \geq 4$).

11. CULTIVO CELULAR, MANTENIMIENTO DE LÍNEAS CELULARES E INFECCIÓN DE CÉLULAS EN CULTIVO

La línea celular de carcinoma pulmonar humano A549 (ATCC CCL185), derivada de neumocitos humanos tipo II, se cultivó empleando RPMI-1640 (Roswell Park Memorial Institute) (PAA) suplementando con suero bovino fetal inactivado 10% (SBF, PAA), HEPES 10 mM (PAA) y una combinación de antibióticos y antimicóticos (PAA) que contiene penicilina 100 unidades/ml, sulfato de estreptomicina 0.1 mg/ml y anfotericina B 0.25 $\mu\text{g}/\text{ml}$. Este medio fue denominado RPMI completo. Las células se crecieron en frascos de 25 cm^2 , en una atmósfera saturada de humedad al 95%, con 5% CO_2 a 37°C . El SBF se inactivó en un baño húmedo a 60°C durante 1 h.

Los **ensayos de infección** de células A549 con HiNT se llevaron a cabo en placas de 24 pocillos. Cuando el experimento requirió la observación del material infectado con un microscopio de fluorescencia, las células se crecieron en pocillos sobre cubreobjetos de vidrio de 13 mm de diámetro. Se depositaron 8×10^4 células/pocillo, que se incubaron en RPMI completo durante 48 h para alcanzar ~90% de confluencia, $\sim 4\text{-}5 \times 10^5$ células/pocillo. Para sincronizar el ciclo celular, el medio

RPMI completo se sustituyó por RPMI-1640 con HEPES y antibióticos, sin SBF, 16 h antes de la infección. Previo a la infección, las células se lavaron tres veces con PBS y se añadió 1 ml de EBSS (Earle's Balanced Salt Solution, Invitrogen) por pocillo. En todos los casos, las infecciones se realizaron en medio EBSS. En los experimentos en los que se realizaron infecciones sobre células superconfluentes, se depositaron 8×10^4 células/pocillo, que se incubaron durante 72 h. 16 h antes de la infección, el medio RPMI completo se cambió por RPMI-1640 con HEPES y antibióticos, sin SBF.

Para la infección con HiNT, las bacterias crecidas en placas de Agar-chocolate durante 16 h a 37°C y 5% CO₂ se recogieron con 1 ml de PBS. Esta suspensión bacteriana se ajustó con PBS a una densidad óptica DO₆₀₀=1 ($\sim 10^9$ u.f.c./ml). Se añadieron 100 µl de esta suspensión a cada pocillo en 1 ml de EBSS, para obtener una multiplicidad de infección aproximada de 100 bacterias por célula (MOI 100:1).

Experimentos de adhesión bacteriana a epitelio respiratorio: la determinación de la adhesión de HiNT al epitelio respiratorio se llevó a cabo mediante infección de las células en cultivo y procesamiento del material para cuantificación de u.f.c. Las células A549 fueron infectadas en EBSS durante 30 min. Nos referimos a este tiempo de infección como “tiempo de contacto”, tras el cual los pocillos se lavaron cinco veces con PBS y las células se lisaron con 300 µl de PBS-Saponina 0.025% durante 10 min a TA. Se realizaron diluciones seriadas de los lisados celulares, que fueron plaqueadas en sBHI-Agar. Las bacterias se enumeraron mediante recuento de u.f.c (**Fig. 13**). Alternativamente, cuando la infección se llevó a cabo sobre cubreobjetos, las células fueron fijadas para su procesamiento posterior mediante microscopía (apartado 13 de la sección Materiales y Métodos). Los experimentos se realizaron por triplicado, al menos en tres ocasiones independientes ($n \geq 9$).

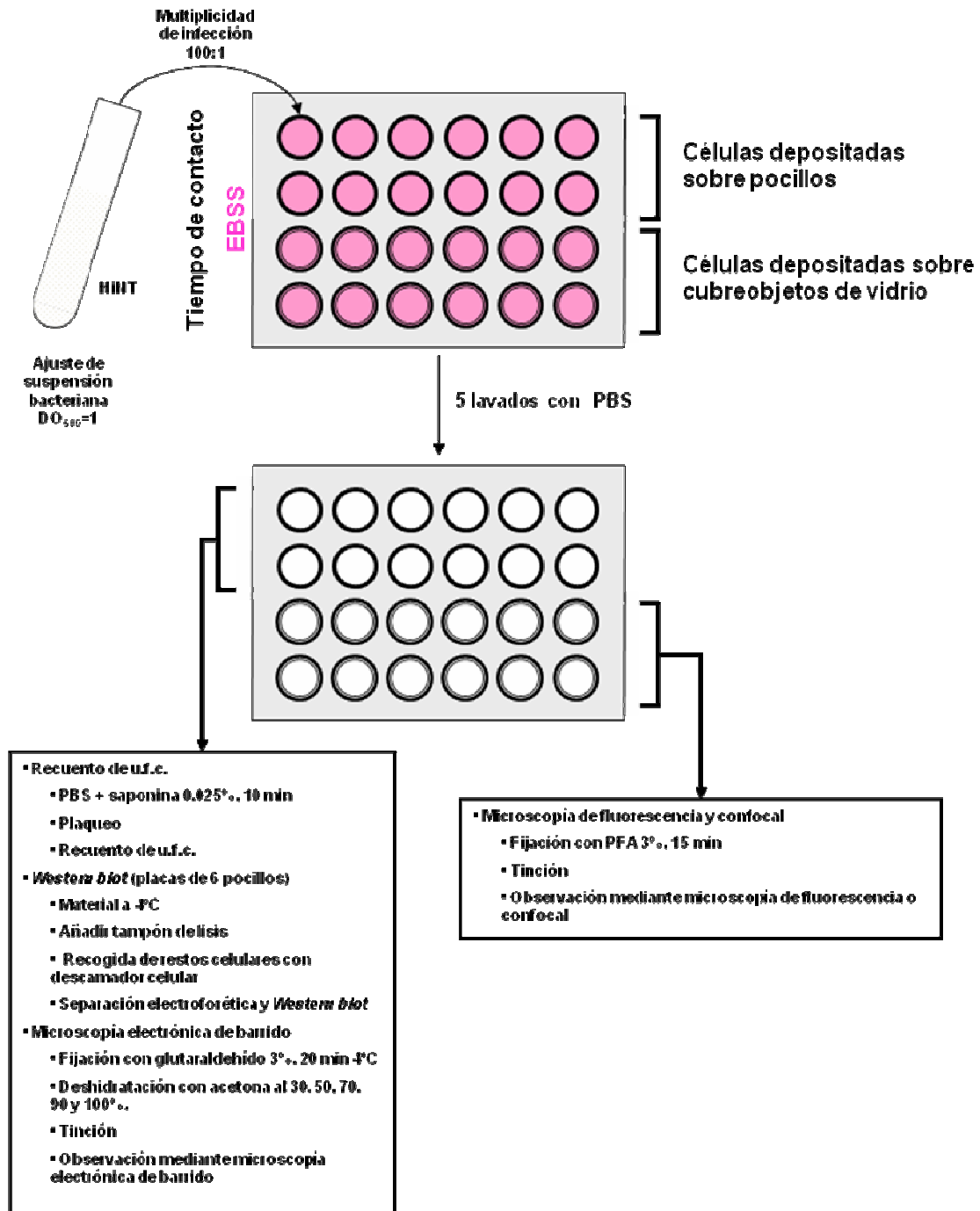


Figura 13: Procesamiento de células en cultivo infectadas con HiNT en experimentos de adhesión.

Invasión del epitelio respiratorio por HiNT: las células A549 fueron infectadas en medio EBSS con HiNT durante 2 h. La suspensión bacteriana empleada para infectar se preparó como se describe previamente. Una vez transcurrido el tiempo de contacto, los pocillos se lavaron tres veces con PBS y se incubaron en medio RPMI-1640 con HEPES y SBF, en el que se añadió gentamicina 200 µg/ml durante 1 h. La gentamicina es un antibiótico que se utilizó para eliminar selectivamente la población bacteriana extracelular. Los pocillos se lavaron tres veces con PBS y las

células fueron lisadas con 300 μ l de PBS-Saponina 0.025% durante 10 min a TA. Se realizaron diluciones seriadas que fueron plaqueadas en sBHI-Agar. Las bacterias intracelulares se enumeraron mediante recuento de u.f.c. (**Fig.14**). Los experimentos se realizaron por triplicado, al menos en tres ocasiones independientes ($n \geq 9$).

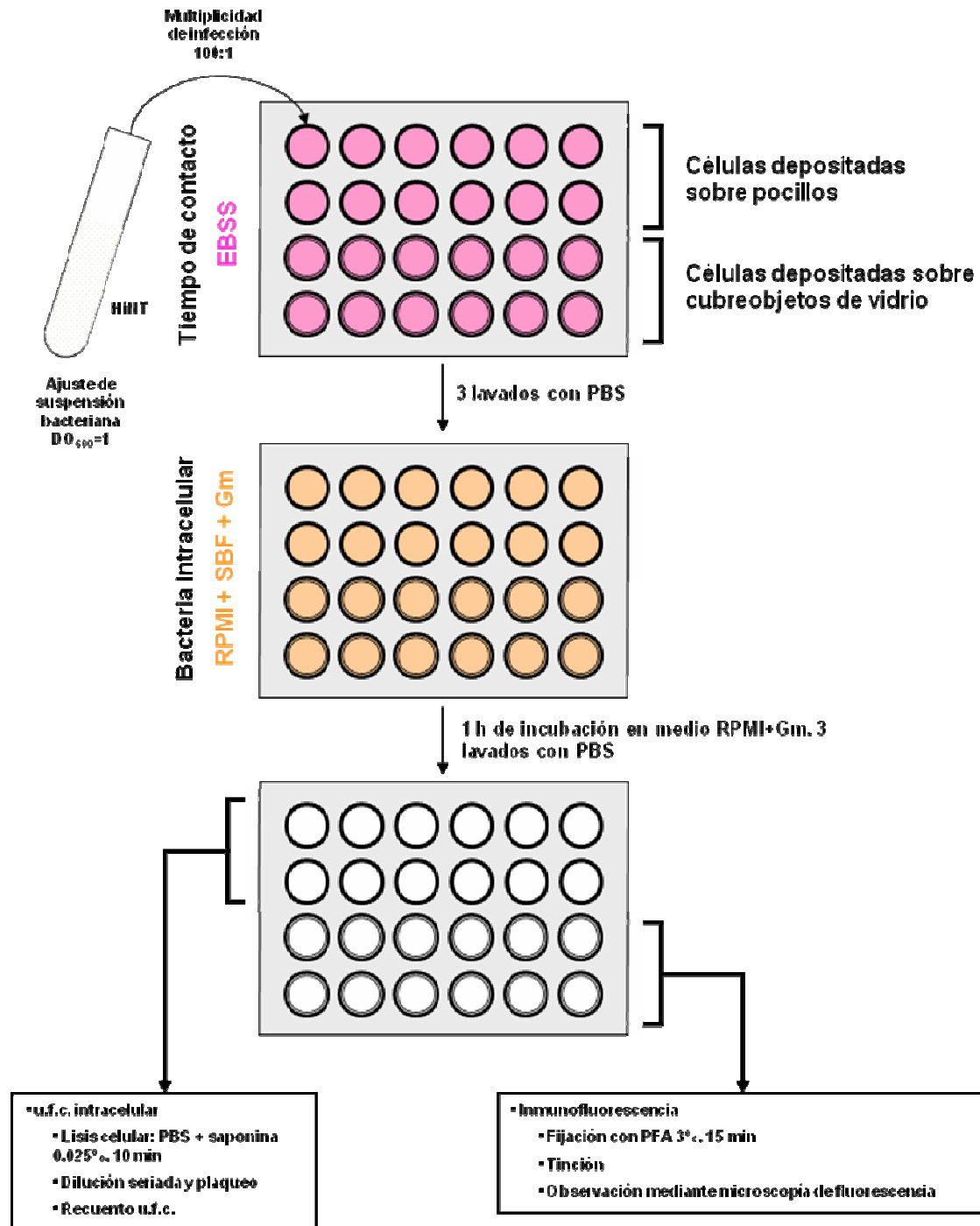


Figura 14: Procesamiento de células en cultivo infectadas con HiNT en experimentos de invasión.

Exposición celular a inhibidores químicos: cuando fue necesario, la infección de células epiteliales se realizó sobre células pre-expuestas a agentes farmacológicos. Los compuestos, cuya actividad y condiciones de trabajo se detallan en la **Tabla 4 (Anexo II)**, se añadieron a los pocillos que contenían 1 ml de EBSS. Una vez transcurrido el tiempo de cada pre-tratamiento, se realizó la infección con HiNT como se ha descrito previamente. Dependiendo de cada caso, el agente farmacológico se mantuvo durante el tiempo de contacto bacteriano o fue sustituido por EBSS previo a la adición de la suspensión bacteriana. Las tasas de adhesión e invasión bacteriana se determinaron como se ha descrito previamente. Para analizar la viabilidad bacteriana frente a cada compuesto farmacológico, se mezclaron 1 ml de EBSS con 100 µl de una suspensión de HiNT de $DO_{600nm}=1$ en un tubo eppendorf® y se incubó con cada compuesto a la concentración de trabajo indicada durante 2 h. Transcurrido este tiempo, se realizaron diluciones seriadas, plaqueo en sBHI-Agar y recuento de u.f.c.. El porcentaje de viabilidad bacteriana se calculó como $(\text{u.f.c. bacterias tratadas} / \text{u.f.c. bacterias control no expuestas al agente farmacológico}) \times 100$ (**Fig. 15**).

12. TRANSFECCIONES TRANSITORIAS

Los ensayos de transfección de células A549 se realizaron en placas de 24 pocillos. Se depositaron 4×10^4 células/pocillo, que se incubaron en RPMI completo durante 24 h para alcanzar ~40% de confluencia. Transcurridas las 24 h, los pocillos se lavaron tres veces con PBS y se incubaron con 400 µl de medio Opti-MEM (Invitrogen). Las transfecciones se llevaron a cabo con 1 µg de ADN plasmídico, o con 50-100 nmol, según el caso, de ARN de interferencia de doble cadena (dsARNi). En ambos casos, se utilizó 1.25 µl de Lipofectamina 2000 (Invitrogen) por pocillo.

En detalle, se empleó un tubo eppendorf donde se mezclaron 100 µl de Opti-MEM con 1 µg de ADN plasmídico o 100 µl de Opti-MEM con 50-100 nmol de dsARNi. En ambos casos, se añadió 1.25 µl de Lipofectamina 2000/tubo. La mezcla se incubó a TA durante 20 min. Los 100 µl de esta mezcla fueron añadidos al pocillo en el que previamente se habían dispensado 400 µl de Opti-MEM. Los pocillos se incubaron durante 6 h. A continuación, el medio se cambió por RPMI-1640 con SBF y HEPES. Las células se mantuvieron en este medio durante 48 h, momento en el cual fueron infectadas con HiNT como se ha descrito previamente. Los plásmidos y los dsARNi utilizados en este trabajo están detallados en la **Tabla 5 (ANEXO I)**. En cada caso, se determinaron las tasas de adhesión e invasión bacterianas tal y como se ha descrito previamente.

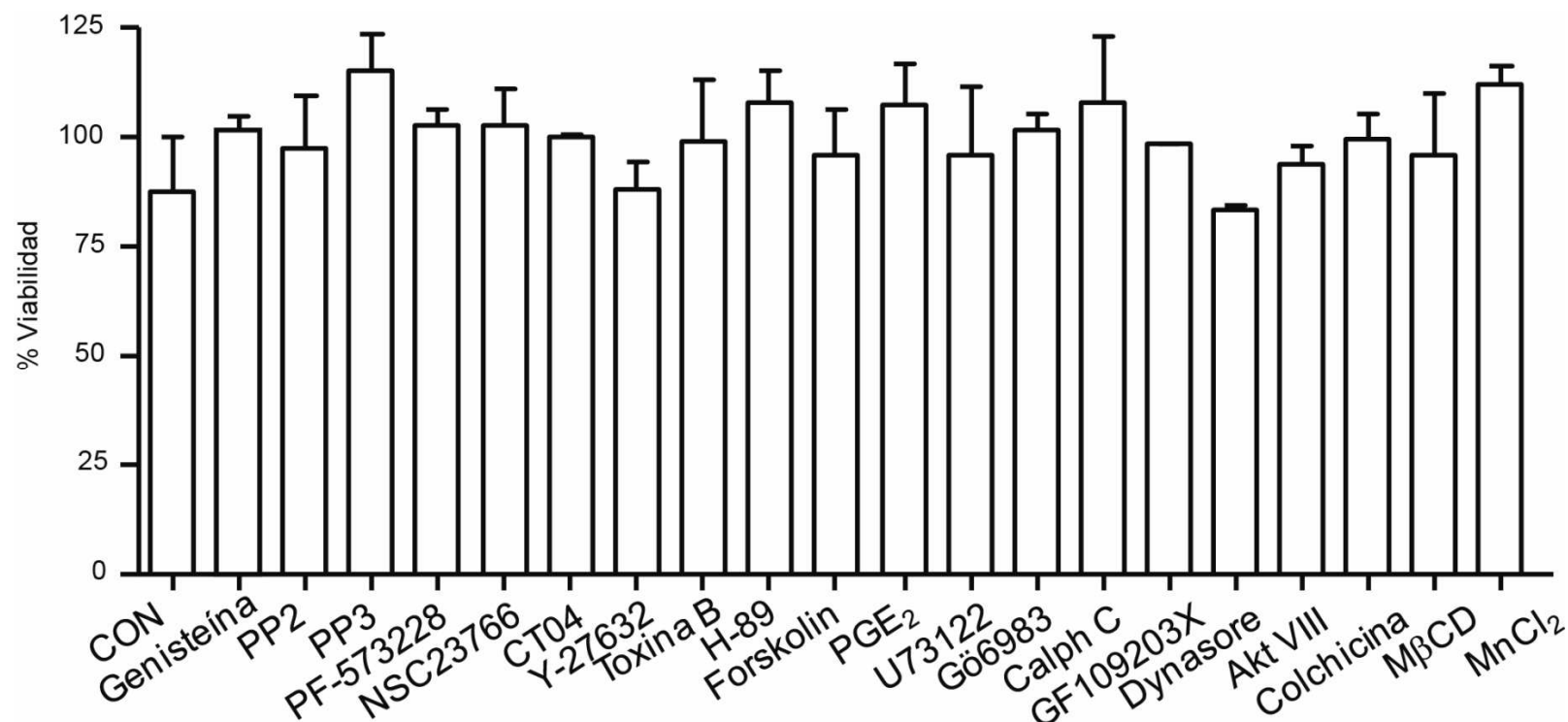


Figura 15. La exposición a los inhibidores químicos no modificó la viabilidad bacteriana. 100 μ l de una suspensión de HiNT375 a $DO_{600nm}=1$, generada tal y como se prepara el inóculo bacteriano empleado para realizar una infección, fueron incubados en 1 ml de EBSS durante 2 h, con cada uno de los inhibidores químicos usados. A continuación, se plaquearon diluciones seriadas de cada suspensión bacteriana en sBHI-Agar. Los resultados están expresados en % de viabilidad con respecto al control (CON), bacterias incubadas en ausencia de inhibidor, cuyo recuento fue considerado como 100%.

13. TINCIÓN Y MICROSCOPIA DE FLUORESCENCIA

Las células epiteliales depositadas, crecidas e infectadas sobre cubreobjetos de vidrio de 13 mm de diámetro en placas de 24 pocillos se fijaron con paraformaldehído (PFA) 3% durante 15 min a TA. A continuación, se lavaron tres veces con PBS y se conservaron a 4°C en 1 ml de PBS con 14 µl de NH₄Cl 1M hasta su tinción.

Las bacterias y las moléculas/estructuras celulares de interés se tiñeron mediante inmunofluorescencia directa o indirecta, según cada caso. El anticuerpo primario conejo anti-HiNT fue generado por nuestro laboratorio (Dr. Pau Morey) y se empleó a una dilución 1:800. El anticuerpo secundario burro anti-conejo conjugado con rodamina-RedX (RRX) fue proporcionado por Jackson Immunological y se utilizó a una dilución 1:200. El ADN se tiñó con Hoechst 33342 (Invitrogen) diluido 1:2500. La integrina β 1 se tiñó con anticuerpo primario cabra anti- β 1 (Santa Cruz Biotechnology sc-6622) diluido 1:10. El anticuerpo secundario burro anti-cabra conjugado Cy2 fue proporcionado por Jackson Immunological y se utilizó a una dilución 1:200. En todos los casos, las tinciones se realizaron en un volumen de 40 µl de PBS con suero de caballo 10%, saponina 0.1% y los marcadores y/o anticuerpos correspondientes. Los cubreobjetos se lavaron dos veces con PBS-saponina 0.1%, una vez con PBS y se incubaron en una cámara húmeda en oscuridad con el anticuerpo primario durante 30 min. A continuación, los cubreobjetos se lavaron dos veces con PBS-saponina 0.1%, una vez con PBS y se incubaron en una cámara húmeda en oscuridad con el anticuerpo secundario durante 30 min. Tras las incubaciones pertinentes, los cubreobjetos se lavaron dos veces con PBS-saponina 0.1%, una vez con PBS y una vez con agua destilada y se montaron sobre un portaobjetos con el gel montador Prolong Gold antifade (Invitrogen). Las muestras se conservaron a 4°C en oscuridad. El material teñido se analizó con un microscopio de fluorescencia Leica CTR6000. Las imágenes se tomaron con una cámara LeicaDFC350FX.

14. MICROSCOPIA ELECTRÓNICA DE BARRIDO

Las células epiteliales depositadas, crecidas e infectadas sobre cubreobjetos de vidrio de 13 mm de diámetro en placas de 24 pocillos se fijaron con glutaraldehído frío 3% durante 20 min a 4°C. Las muestras fueron deshidratadas en una serie gradual de acetona al 30-50-70-90-100% durante 10' cada una. Una vez deshidratadas, las muestras se recubrieron con oro con un *Fine coat ion sputter* JFC-1100 (JEOL, Ltd). El

material fijado se analizó con un microscopio de barrido Inspect S microscope (FEI Company) a un voltaje de 15-20 KV. Esta parte del trabajo se realizó en colaboración con el Dr. José Ramos Vivas, Fundación Hospital Marqués de Valdecilla, Santander.

15. ANÁLISIS DE PROTEÍNAS MEDIANTE ELECTROFORESIS EN GEL DE POLIACRILAMIDA CON SDS (SDS-PAGE) Y WESTERN BLOT

Los ensayos de infección de células A549 con HiNT se llevaron a cabo en placas de 6 pocillos. Se depositaron $1-2 \times 10^6$ células/pocillo, que se incubaron durante 48 h para alcanzar ~90% de confluencia. El medio RPMI completo se sustituyó por RPMI-1640 con HEPES y antibióticos 16 h antes de la infección. En cada caso, antes de llevar a cabo la infección, los pocillos se lavaron tres veces con PBS y se añadieron 4 ml de EBSS/pocillo. Las células se infectaron con HiNT, empleando 800 μ l/pocillo de una suspensión bacteriana generada como se indica en el apartado 8 de la Sección Materiales y Métodos. Trascurrido el tiempo correspondiente, los pocillos se lavaron tres veces con PBS frío manteniendo las placas en hielo. A continuación, las células se lisaron con 100 μ l de tampón de carga (Tris-HCl 62.5 mM pH 6.8, SDS 2% p/v glicerol 10% DTT 50 mM; azul de bromofenol 0.01% p/v) por pocillo. El material biológico se recogió con un descamador celular y se transfirió a un tubo eppendorf®. Los extractos celulares se sonicaron durante 15 s, se hirvieron a 100°C durante 10 min y se enfriaron en hielo. El análisis electroforético de las proteínas presentes en los extractos celulares se realizó utilizando geles desnaturalizantes al 10% de poliacrilamida con SDS (fase de resolución). Para ello, se utilizó un equipo Mini-protean® de Bio-Rad. Tras la electroforesis, las proteínas se transfirieron a una membrana de nitrocelulosa o de PVDF, dependiendo de la proteína de interés. Se utilizó un sistema de transferencia semihúmedo (Trans-Blot® *SD semidry transfer cell* de Bio-Rad), aplicando un voltaje de 10 V durante 35 min. La eficiencia de la transferencia se controló tiñendo la membrana con una solución comercial de Ponceau S (Sigma). A continuación, la membrana se bloqueó durante 16 h con leche en polvo 4% disuelta en TBS. Los anticuerpos primarios utilizados, así como las condiciones de uso y las especificaciones de cada *Western blot* están detallados en la **Tabla 6 (ANEXO I)**. Los anticuerpos secundarios utilizados fueron: ratón anti-conejo conjugado a peroxidasa de rábano (HRP, del inglés *Horseradish peroxidase*) (Sigma, ref. A4914) diluido 1:1000; conejo anti-ratón conjugado a HRP (Pierce, ref. 1858413) diluido 1:1000; y conejo anti-cabra conjugado a HRP (Santa Cruz Biotechnology sc-6622) diluido 1:5000. Las membranas se incubaron con los anticuerpos secundarios durante

1 h a TA. Las bandas se detectaron mediante el kit *ECL Advance™ Western Blotting Detection kit*.

Cuando fue necesario, las membranas se lavaron dos veces con PBS-Tween 20 0.5% durante 15 min/lavado y los anticuerpos se eliminaron de las membranas mediante incubación durante 30 min con la solución “*Restore Western Blot Stripping Buffer*” (Pierce). Transcurrida esta incubación, las membranas se lavaron dos veces con PBS-Tween 20 0.5% durante 15 min/lavado. Tras el segundo lavado, las membranas se incubaron con los anticuerpos primarios y secundarios deseados. Como control de carga, se analizó en cada caso la cantidad de tubulina en los extractos mediante *Western Blot* con un anticuerpo primario ratón anti-tubulina humana (Sigma, ref. T5168) diluido 1:3000 y el anticuerpo secundario conejo anti-ratón citado previamente. Las bandas se detectaron mediante el kit *SuperSignal® West Dura Extended Duration Substrate* (Thermo, ref. 34075).

16. INFECCIÓN INTRANASAL DE RATONES CD1

Se emplearon ratones CD1 hembra (Charles River, Elbeuf, Francia) de 4-6 semanas de vida y 20-22 g. Los animales se alojaron en jaulas adecuadas (Nº registro animalarios UPNA, ES/31-2016-000002-CR-SU-US) con agua y alimento *ad libitum* antes de comenzar los experimentos, siguiendo las recomendaciones del Comité de Ética y Experimentación Animal y Bioseguridad (CEEAB) y según la legislación vigente RD 1261/2005.

La cepa de interés se realsó del *stock* almacenado a -80°C en una placa de Agar-chocolate y se creció durante 12 h a 37°C con 5% CO₂. Las bacterias se recogieron con 1 ml de PBS. Esta suspensión bacteriana se ajustó con PBS a una DO₆₀₀=1 (~10⁹ u.f.c./ml). 4,16 ml de la suspensión bacteriana ajustada fueron centrifugados durante 5 min a 3.500 r.p.m. El *pellet* se resuspendió en 1 ml de PBS. De esta forma, se obtuvo una suspensión bacteriana con una concentración ~ 5x10⁹ u.f.c./ml.

Los animales se anestesiaron intraperitonealmente con 20 μ l de una mezcla que contiene 375 μ l de Ketamina (Imagene 1000 de Merial Ref: 03661103001881), 375 μ l de PBS y 250 μ l de Rompun (Bayer KP05965). Cada animal fue inoculado intranasalmente con 20 μ l de la suspensión bacteriana (~10⁸ u.f.c./animal), colocando la punta de una micropipeta (punta amarilla empleada en micropipetas 10-200 μ l) sobre la nariz sin tocarla y dejando que el animal respire la gota de inóculo bacteriano. Tras la inoculación, los ratones se colocaron sobre una manta eléctrica durante 30 min para recuperarlos de la anestesia. 24 y 48 h post-infección, los ratones se sacrificaron

y los pulmones se diseccionaron. Los pulmones de cada animal se colocaron en bolsas individuales previamente pesadas y se añadió PBS a la bolsa (1:9 p/v). Los órganos se homogenizaron y se realizaron diluciones seriadas en PBS hasta 10^{-4} . 100 μ l de cada dilución fueron plaqueados por triplicado en placas de sBHI-Agar. Por otro lado, las tráqueas de los animales sacrificados a las 48 h post-infección fueron diseccionadas, fijadas, embebidas en parafina y procesadas para inmunohistoquímica. HiNT se tiñó mediante un anticuerpo primario conejo anti-HiNT y un anticuerpo secundario anti-conejo conjugado a HRP. Las imágenes son cortesía de la Dra. María Jesús Grilló, I. Agrobiotecnología-UPNA-CSIC.

17. ANÁLISIS ESTADÍSTICO

Los resultados están expresados como la media \pm la desviación estándar. Las barras de error de las gráficas corresponden al error típico. La igualdad de los resultados se contrastó a partir de un análisis de la varianza (ANOVA) de dos colas, el test *t* de *Student*, empleando el programa informático GraphPad Prism versión 4. Las diferencias se consideraron estadísticamente significativas si el valor de *P* fue ≤ 0.05 .

RESULTADOS

CAPÍTULO 1: ANÁLISIS DE LA CONTRIBUCIÓN RELATIVA DE LAS MODIFICACIONES DE LA MOLÉCULA DE LIPOOLIGOSACÁRIDO A FENOTIPOS ASOCIADOS A LA PATOGÉNESIS DE HiNT

1.1. Respuestas del hospedador a la infección por aislados clínicos de HiNT de pacientes respiratorios crónicos

HiNT causa infecciones agudas, crónicas y agudizaciones de tipo microbiano en pacientes que sufren enfermedades respiratorias crónicas, a menudo contribuyendo a la progresión de la enfermedad. En nuestro laboratorio, mediante una colaboración establecida con la Dra. J. Liñares (Hospital Universitario Bellvitge, Barcelona), hemos dispuesto de una colección de 20 sets de cepas clínicas de HiNT aisladas de 20 pacientes respiratorios crónicos (1 set por paciente) durante diferentes visitas médicas como consecuencia de una agudización de la enfermedad crónica subyacente (**Tabla 7, ANEXO I**). Esta colección de aislados clínicos ha sido analizada de forma retrospectiva. La clonalidad de los aislados clínicos se analizó mediante PFGE. El tipado molecular mostró que los aislados clínicos de 14 pacientes (pacientes 1 a 14, grupo A) presentan perfiles de PFGE diferentes. Por el contrario, en los sets de aislados clínicos de 6 pacientes (pacientes 15 a 20, grupo B), al menos dos aislados por set presentan el mismo perfil de PFGE (datos proporcionados por Dr. Laura Calatayud, H. Bellvitge). Los aislados con el mismo perfil de PFGE se consideraron isogénicos (misma cepa), proponiendo que son cepas que pueden causar una infección crónica, al ser aisladas en al menos dos visitas médicas independientes (**Tabla 7, ANEXO I**). El análisis de la distribución de genes implicados en la biosíntesis del LOS reveló que todos los aislados presentan los genes *lgtF*, *lic2A*, *lic1ABCD*, *lic3A* y *lic3B*, lo que implica la posible modificación de la molécula de LOS en la Hep I, con digalactosa, PCho o ácido siálico. Sin embargo, la distribución del gen *lic2C* es heterogénea, estando presente en 63% de los aislados, por lo que la modificación de la molécula de LOS en la Hep II es un factor variable (datos proporcionados por Pau Martí-Llitas, FISIB).

En este trabajo, se realizó una selección de aislados clínicos de esta colección retrospectiva disponible para analizar tres fenotipos asociados a la virulencia de HiNT, la resistencia del patógeno al ataque bactericida de los péptidos antimicrobianos (PAs), la formación de biopelículas y la adhesión bacteriana al epitelio pulmonar humano. Las características de los aislados seleccionados se muestran en la **Tabla 6**.

Tabla 6. Características de las cepas clínicas de HiNT seleccionadas en este trabajo.

Paciente	Cepa HiNT	Fecha aislado	Sexo/Edad	Enfermedad subyacente	PFGE	lic2C
1	629	12/12/1997	Hombre/64	Enfisema severo	Hi-44	-
	846	1/4/1998			Hi-43	-
10	995	30/6/1998	Hombre/38	EPOC	Hi-27	+
13	322	12/12/1996	Hombre/68	EPOC	Hi-60	+
	865	14/4/1998			Hi-59	-
	1244	8/3/1999			Hi-58	+
	1715	16/11/2000			Hi-61	+
16	350	13/1/1997	Mujer/72	Asma bronquial crónica	Hi-23	-
17	411	17/2/1997	Hombre/56	Bronquiectasis	Hi-13	+
	584	7/11/1997			Hi-13	+
	1104	9/11/1998			Hi-13	+
18	628	15/12/1997	Hombre/69	Patología desconocida	Hi-55	-
	920	8/5/1998			Hi-55	+
19	735	10/2/1998	Mujer/73	Bronquiectasis	Hi-56	-
	1340	15/6/1999			Hi-57	-
	1684	3/10/2000			Hi-57	-

1.1.1. Resistencia de aislados clínicos de HiNT al ataque bactericida de péptidos antimicrobianos

Para llevar a cabo el análisis de resistencia a péptidos antimicrobianos (PAs), se seleccionaron aislados representativos de pacientes y perfil de PFGE. Los aislados seleccionados fueron HiNT629, 995, 322, 865, 350, 411, 584, 1104, 628, 920, 735, 1340 y 1684 (**Tabla 6**). Los PAs son péptidos solubles, elementos integrantes de la inmunidad innata del hospedador cargados positivamente. Los PAs actúan mediante interacción electrostática con la superficie bacteriana, en particular con el lípido A de bacterias Gram negativas, que es una molécula aniónica (Brogden, 2005; Hancock & Chapple, 1999; Nicolas & Mor, 1995; Vaara, 1992).

Se analizó la resistencia de HiNT a polimixina B. Las polimixinas son lipopéptidos anfipáticos pentacatiónicos sintéticos, activos frente a bacterias Gram

negativas. De forma similar a los péptidos antimicrobianos naturales, las polimixinas interaccionan con el LPS aniónico (Evans *et al.*, 1999; Hermesen *et al.*, 2003). Cada cepa se incubó en ausencia (control) o presencia de un rango creciente de concentraciones de polimixina B durante 60 min. La supervivencia de cada cepa en presencia de cada concentración de péptido se comparó con la supervivencia bacteriana sin péptido. Los datos están expresados en % de supervivencia con respecto al control (ausencia de péptido), considerado como 100%. La resistencia a polimixina B fue variable entre aislados clínicos. No pudimos establecer una asociación entre *lic2C* y resistencia a péptidos antimicrobianos, excluyendo, por tanto, las sustituciones oligosacáridicas en la Hep II del LOS en este proceso. Sin embargo, se observó un incremento progresivo en la resistencia a polimixina B de los aislados clínicos de los pacientes 17, 18 y 19 (**Tabla 7**). Los aislados de estos pacientes son isogénicos intra-paciente, por ejemplo, HiNT411, 584 y 1104, aislados del paciente 17, presentan un mismo perfil de PFGE. Para profundizar en esta observación, se analizó la resistencia a polimixina B tras la incubación de las bacterias con el péptido durante 30 min, lo que confirmó un incremento progresivo de la resistencia a polimixina B en aislados con el mismo perfil de PFGE (**Tabla 8**). A continuación, se analizó la resistencia bacteriana al péptido natural humano β -defensina 1 mediante la incubación de las distintas cepas con concentraciones crecientes de este péptido durante 30 min. Los resultados confirmaron los datos obtenidos con polimixina B. La **Figura 16** ilustra los datos mostrados en la **Tabla 8**.

La resistencia de HiNT a péptidos antimicrobianos está relacionada con la presencia de PCho y con la acilación del lípido A del LOS (Lysenko *et al.*, 2000a; Starner *et al.*, 2002). Todos los aislados clínicos presentaron PCho, por lo que no se pudo establecer una asociación entre PCho y resistencia a péptidos antimicrobianos. Igualmente, todos los aislados clínicos presentaron un lípido A hexaacilado, por lo que no se pudo establecer una asociación entre acilación del lípido A y resistencia a péptidos antimicrobianos (datos obtenidos por P. Martí-Lliteras y Enrique Llobet, FISIB).

En conjunto, los resultados obtenidos muestran variabilidad en la resistencia a péptidos antimicrobianos entre aislados clínicos. Asimismo, se observó una resistencia creciente a polimixina B y a β -defensina 1 en cepas isogénicas aisladas de un mismo paciente respiratorio crónico en visitas médicas independientes. No se pudo establecer una asociación entre resistencia a péptidos y distribución de *lic2C*. Igualmente, no se pudo establecer una asociación entre diferencias en la cantidad de PCho y el perfil de acilación del lípido A con la resistencia a péptidos antimicrobianos mostrados por los aislados clínicos analizados.

Tabla 7. Resistencia de aislados clínicos de HiNT seleccionados a polimixina B. Las dosis de polimixina B empleadas se indican en µg/ml. Los resultados están expresados en % de supervivencia con respecto al control (ausencia de péptido), considerado como 100%, tras la incubación bacteriana con polimixina B durante 60 min.

Paciente	HiNT	1	0.75	0.5	0.25	0.125	0
	375	10.1±2.7	13.5±3.7	91.5±3.9	100	100	100
A	1	629	3.9±0.7	10.6±2.0	83.2±3.5	100	100
	10	995	8.9±3.9	16±7.7	87.1±2.0	97.9±1.9	100
	13	322	4.6±0.8	8.1±3.2	86.8±6.8	100	100
		865	3.7±1.9	8.5±2.7	81.5±6.9	99.5±0.1	100
	16	350	1.5±0.9	6.3±3.9	91.5±3.4	97.2±1.8	99.6±0.2
	17	411	2.2±1.3	4.8±1.7	87.6±3.4	97.9±1.3	100
		584	3.0±0.7	11.1±1.5	86.9±3.2	97.2±2.2	100
		1104	2.9±1.2	8.8±0.9	85.8±1.9	100	100
B	18	628	1.4±0.6	6.7±1.5	86.1±8.2	91.9±5.3	99.5±0.4
		920	7.1±1.6	11.9±2.8	80.5±5.8	94.8±1.4	96.3±2.7
	19	735	4.0±2.9	8.1±1.9	90.1±1.2	100	100
		1340	12.0±3.6	19.2±5.4	78.7±5.6	97.3±2.7	100
		1684	9.0±1.2	19.7±3.8	96±2.8	96.8±2.4	100

Tabla 8. Resistencia de aislados clínicos de HiNT seleccionados a polimixina B y β-defensina 1. Las dosis de polimixina B y β-defensina 1 empleadas se indican en µg/ml. Los resultados están expresados en % de supervivencia con respecto al control (ausencia de péptido), considerado como 100%, después de la incubación con polimixina B y β-defensina 1 durante 30 min.

Péptido antimicrobiano	Paciente	Aislado HiNT	1	0.75	0.5	0
Polimixina B (30 min)	17	411	11.8±0.9	30.9±2.1	93.9±5.5	100
		584	35.5±8.3	69.3±9.3	97.4±2.3	100
		1104	36.7±5.3	78.1±8.5	100	100
	18	628	12.89±1.7	54.6±12.3	96.1±3.6	100
		920	37.22±6.4	74.3±1.6	96.4±3.4	100
	19	735	26.5±6.1	48.9±1.4	96.5±3.4	100
		1340	34.4±3.5	55.4±7.2	99±0.8	
		1684	51.7±5.6	75.1±4.2	100	
β-defensina 1	17	411	57.4±3.7	96.3±2.4		100
		584	84.5±2.4	98.2±1.6		100
		1104	91.2±4.5	100		100
	18	628	61.2±6.5	91.7±3.1		100
		920	87.5±3.1	99.6±0.2		100
	19	735	68.3±10.6	90.6±2.2		100
		1340	87.1±0.4	100		
		1684	94.8±3.6	100		

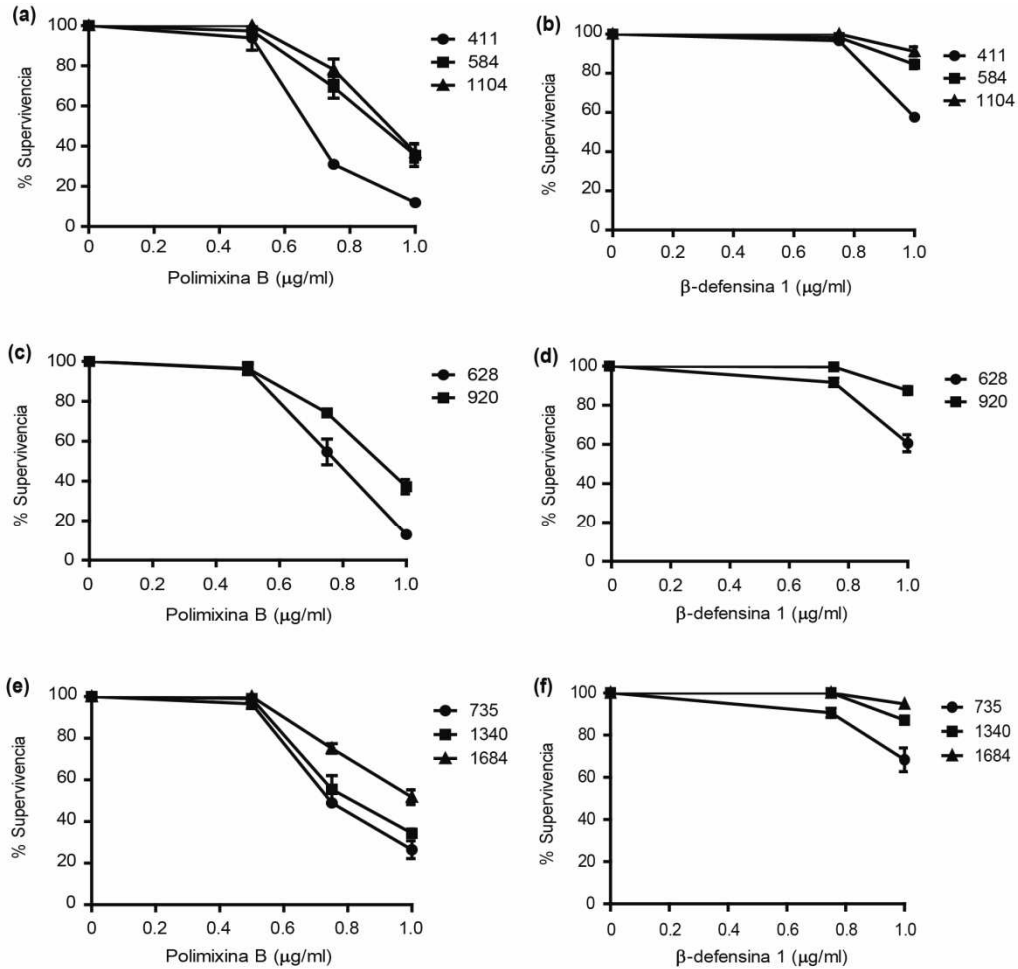


Figura 16. Cepas isogénicas de HiNT aisladas de un mismo paciente respiratorio crónico en visitas médicas independientes presentan resistencia creciente a polimixina B y a β-defensina 1. Las cepas de los pacientes 17 (a y b), 18 (c y d), 19 (e y f) se incubaron en ausencia (control) o presencia de un rango creciente de concentraciones de polimixina B (a, c y e) y β-defensina 1 (b, d y f) durante 30 min. La supervivencia de cada cepa en presencia de cada concentración de péptido se comparó con la supervivencia bacteriana sin péptido. Los datos están expresados en % de supervivencia con respecto al control (ausencia de péptido), considerado como 100%.

1.1.2. Interacción de aislados clínicos de HiNT con el epitelio respiratorio humano

A continuación, se analizó la adhesión a células epiteliales A549 de los aislados clínicos seleccionados previamente a células epiteliales A549 (**Tabla 6**). La tasa de adhesión bacteriana fue variable entre las cepas analizadas (**Fig. 17a**). Sin embargo, los aislados de los pacientes 17, 18 y 19 (aislados isogénicos en cada paciente) mostraron una tasa de adhesión menor a la de los aislados no isogénicos de los pacientes 1, 10, 13 y 16. Así, en conjunto, la tasa media de adhesión de las cepas aisladas de los pacientes 17, 18 y 19 es significativamente menor a la de las cepas aisladas de los pacientes de los pacientes 1, 10, 13 y 16.

HiNT presenta un repertorio de adhesinas a través de las cuales la bacteria interacciona con superficies celulares y/o matriz extracelular (apartado 3.4, sección Introducción). Una de estas proteínas es P5. Como se indica en el apartado 3.4 de la sección Introducción, la predicción estructural de P5 muestra que esta proteína presenta cinco regiones hipervariables expuestas al exterior de la bacteria (*loops* 1-5). Mediante la utilización de los cebadores P5-Fw/P5-Rv se realizó la amplificación por PCR y secuenciación de los productos de PCR obtenidos, para realizar un análisis de secuencia de las cinco regiones expuestas en los aislados clínicos seleccionados. Los resultados obtenidos muestran que la secuencia de P5 fue heterogénea entre aislados. El alineamiento entre secuencias mostró diferentes grados de variabilidad para cada región hipervariable. Así, en el *loop* 1 encontramos 16 secuencias diferentes; en el *loop* 2, 13 secuencias diferentes; en el *loop* 3, 15 secuencias diferentes; en el *loop* 4, 6 secuencias diferentes; y en el *loop* 5, 5 secuencias diferentes. Con respecto al *loop* 1, el motivo GINNNGAIK/Q (rojo) se encontró en 10 aislados, mientras que el motivo GLRALARE (azul) se encontró en 4 aislados. Este tipo de motivos han sido observados previamente en colecciones de aislados distintas a la analizada en este trabajo (Webb & Cripps, 1998). Los *loops* 2, 3 y 5 tuvieron un tamaño similar, mientras que el *loop* 4 fue el más corto. Las secuencias marcadas en gris corresponden a secuencias encontradas anteriormente en nuestro laboratorio en una colección de cepas no isogénicas de origen patológico diverso (Marti-Lliteras *et al.*, 2011); en particular, una secuencia en el *loop* 1, una secuencia en el *loop* 2, cuatro secuencias en el *loop* 3, 3 secuencias en el *loop* 4 y dos secuencias en el *loop* 5. Las cepas que mostraron el mismo PFGE tuvieron una secuencia idéntica en los 5 *loops* de P5 (**Tabla 9**).

P5 es un ligando bacteriano del receptor celular CEACAM1 (Hill *et al.*, 2001). Para garantizar la presencia del receptor en células A549, los ensayos de adhesión se

llevaron a cabo utilizando células superconfluentes, donde la expresión de CEACAM1 es alta (Slevogt *et al.*, 2008). Se analizó la adhesión de cuatro cepas clínicas representativas a células A549 superconfluentes. Las cuatro cepas mostraron niveles de adhesión similares a los obtenidos al emplear monocapas celulares con confluencia ~90%. (Fig. 17b).

Tabla 9. Secuencia de los *loops* extracelulares predichos en la proteína P5 de los aislados de HiNT seleccionados.

Lazo 1	Aislado HiNT
GQASFHDGLRALAREYKV-----GYHRNS	<u>832,955,1082</u>
GQASFHDGVHALHDGVHALARQNKAGYHRNS	<u>1340,1684</u>
GQGSFHDGINNNGAIKQDLEL--GYGHRNT	<u>411,584,1104,628,920</u>
GQGSFHDGINNNGAIKEDLSA--SYGYRRNT	<u>350,573,1250</u>
GQGSFHDGINNNGAIKENLTS--GYGYRRNT	735
GQGSFHDGINNNGAIKQDLEL--GYGYRRNT	2738,865,1244
GQASFHDGLRALAREKV-----GYHRNS	2378
GQGSFHDGINRNRVIDGLPGDYG---RRNT	322
GQGSFHDGINNNGAIKNNLPGY--YGYYRRNT	2875,629
GQGSFHDGINNNGAIKHLTL--SYGYRRNT	2302
GQASFHDGINNNGAIKDLLELTSYGYYRRNT	2612
GQASFHDGINNNGAIKDLLGLASYGYRRNT	846
GQGSFHDGINNNGAIKEDLSSY--YGYYRRNT	1689
GQASFHDGLRALARENKV-----GYHRNS	1715
GQASFHDGLRALAREKNV-----GYHRNS	2801
GQGSFHDGINNNGAIKQNLSSAN-YGYRRNT	995
Lazo 2	Aislado HiNT
DNFGRAKLRNSGQALAKHTN	735
DDFGRAKFRVAGKPKVKHTN	<u>1340,1684</u>
DDFGRAKGRHEGKTKIAKHTN	<u>832,955,1082</u>
DNFGRAKLREAGKPRAKHTN	<u>350,573,1250,411,584,1104,628,920</u>
DDFGRAKGREKGRTVAKHTN	<u>865,1244,2738,2801</u>
DNFGRVKARQERKTLAKHTN	2378,322,629
DNFGRVKFRAEGKTEAKHTN	2612
DNFGRAKLREAGKPKAKHTN	2875
DNFGRAKLRANGQTLAKHTN	2302
DDFGRVKLRLAGKPKVKHTN	846
DNFGRVKLRLAGKPKVKHTN	1689
DDFGRAKGREKGKTVAKHTN	1715
DNFGRVKLREAGKPKAKHTN	995
Lazo 3	Aislado HiNT
VRSDYKFY---GTRDHKKGR	<u>1340,1684</u>
VRSDYKFYT---GTRNRDIGR	<u>832,955,1082</u>
VRSDYKFYEVANGTREKKGR	<u>350,573,1250,322,629</u>
VRSDYKVYEVADGTRDHKKGR	735
VRSDYKFYADANGTRDHKKGR	<u>411,584,1104,628,920</u>
VRSDYKLYNKNSSTLKDLEH	<u>1244,2738,2801</u>
VRSDYKFYEDANGTRKHKEGR	2302
VRSDYKFYEAANGTRDHKKGR	2875
VRSDYKFYDKNGSTFKNPGEH	865
VRSDYKFYEVANGTRDHKKGR	2612
VRSDYKFYEVANGTRDYN	2378
VRSDYKFYEDANGTRDHKKGR	846
VRSDYKFYEEANGTRDHKKSR	1689
VRSDYKLYNKNSSTNLKLN	1715
VRSDYK-YEVANGTRDHKKGR	995
Lazo 4	Aislado HiNT
LTRVGKYRAQDK	735
LTRVGKLRTQDK	<u>832,955,1082</u>
LTRVGKYRPQDK	<u>350,573,1250,411,584,1104,628,920,2612,2738,865,1244,846,1</u>
	<u>689,1340,1684,995</u>
LTRVGKYRTQKT	1715,2801

Resultados

LTRVGKYRPQDN	2378
LTRVGKFRTQDK	2875,322,629,2302
Lazo 5	Aislado HiNT
RFGQGAAP-VVAAPEVVSKT	350,573,1250,411,584,1104,628,920,1340,1684,2612,2875,322,629,846,832,955,1082,735,2302,2738,865,1689,
RFGQGEAP-VVAAPEMVSKT	2801,995
RFGQGSVPAPVVAPEMVSKT	2378
RFGQ-AAP-VVAAPEMVSKT	1244
RFGQGAAP-VVAAPEMVSKT	1715

1.1.3. Formación de biopelículas de aislados clínicos de HiNT sobre superficies abióticas

Se analizó la formación de biopelículas de los aislados clínicos seleccionados. Para ello, empleamos microfermentadores de flujo continuo. La biopelícula formada se desprendió de la espátula y paredes del microfermentador mediante agitación suave, generándose una suspensión bacteriana en PBS cuya DO₆₀₀ fue cuantificada.

La formación de biopelícula de los aislados clínicos no isogénicos (HiNT322, HiNT865 y HiNT995) fue significativamente mayor a la formada por los aislados clínicos isogénicos (HiNT411, HiNT584, HiNT995, HiNT628, HiNT920, HiNT735, HiNT1340 y HiNT1684).

Tabla 10. Formación de biopelículas de los aislados clínicos seleccionados. La biopelícula formada se desprendió de la espátula y paredes del microfermentador mediante agitación suave, generándose una suspensión bacteriana en PBS cuya DO₆₀₀ fue cuantificada.

Cepa	DO _{600nm}
HiNT322	1.02 ± 0.49
HiNT865	1.65 ± 0.23
HiNT995	1.57 ± 0.19
HiNT411	0
HiNT584	0
HiNT1104	0
HiNT628	0.01 ± 0.01
HiNT920	0.15 ± 0.15
HiNT735	0
HiNT1340	0
HiNT1684	0

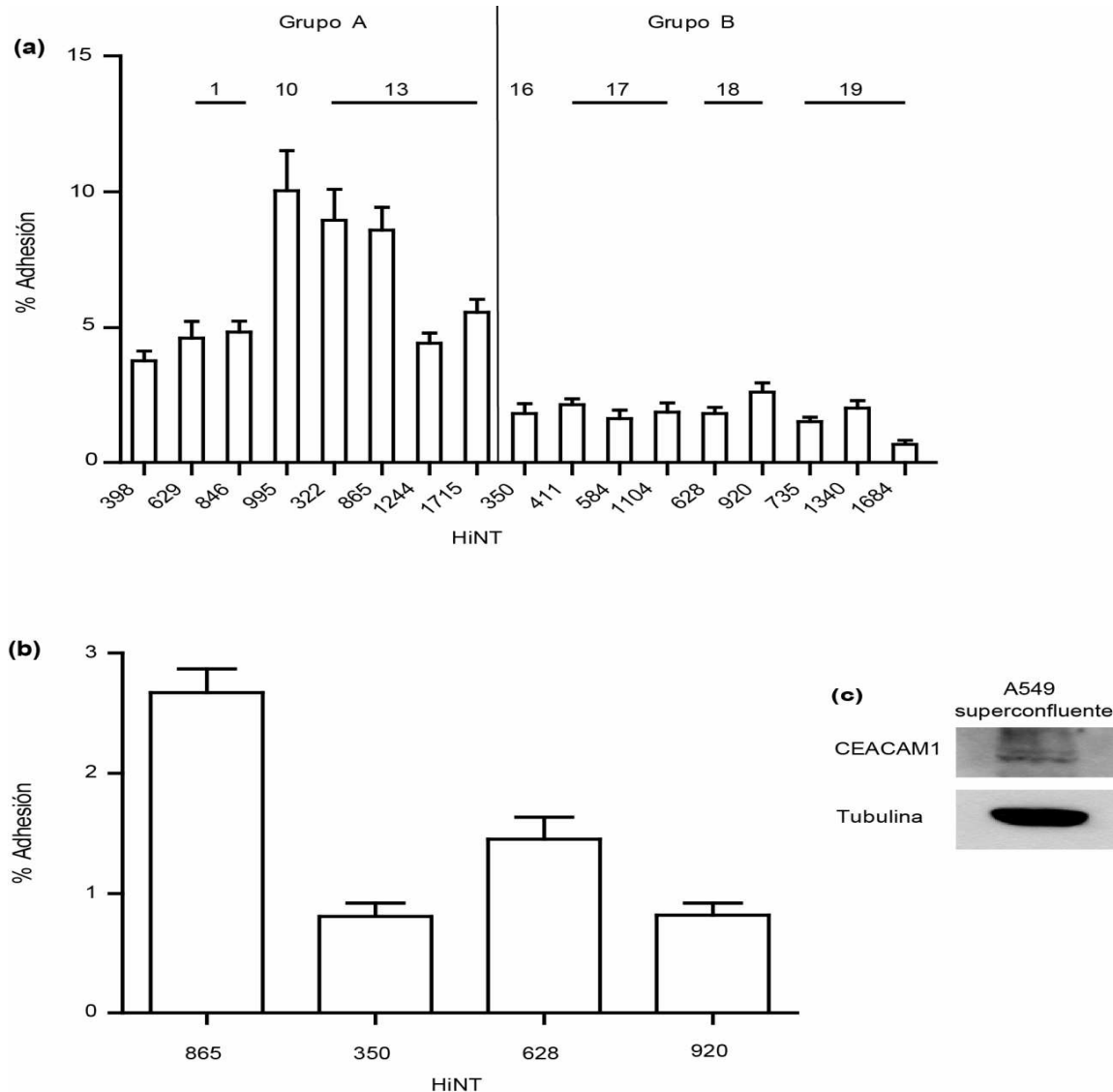


Figura 17. Adhesión de aislados clínicos de HiNT a células A549. (a) Las células A549 se infectaron con los aislados clínicos de HiNT seleccionados durante 30 min, empleando una MOI 1:100. La adhesión bacteriana se determinó como % Adhesión= (u.f.c. output/u.f.c. input)/100. (b) Análisis de la adhesión de cuatro aislados clínicos seleccionados a células A549 superconfluentes. La adhesión bacteriana fue determinada como en (a). (c) Detección del receptor CEACAM1 en células A549 superconfluentes mediante *Western blot* empleando anticuerpo primario ratón anti-CEACAM1 y un anticuerpo secundario cabra anti-ratón conjugado a HRP. Los extractos fueron preparados a partir de células no infectadas. La detección de tubulina se usó como control.

1.2. Análisis de la contribución relativa de las sustituciones del LOS de HiNT a fenotipos asociados a patogénesis mediante la caracterización de cepas mutantes

El análisis fenotípico en aislados clínicos resultó informativo, si bien no permitió el establecimiento de asociaciones claras entre genes que codifican enzimas implicadas en la síntesis del LOS y los fenotipos analizados. Para profundizar en este aspecto, se empleó una cepa de HiNT cuya estructura de LOS es conocida, y un conjunto de mutantes isogénicos generados en nuestro laboratorio que presentan la molécula de LOS progresivamente truncada (cepas generadas por el Dr. Pau Morey). HiNT375 es un aislado clínico pediátrico que ha sido empleado como cepa de referencia para la generación de estirpes mutantes (Bouchet *et al.*, 2003). La **Figura 9** (apartado 3.4.1., sección Introducción) describe la estructura del LOS de HiNT375. Esta molécula presenta ramificaciones oligosacarídicas en las Hep I y III. No contiene los genes *lic2BC*, por lo que carece de ramificación en la Hep II. Presenta dos posibles glicoformas en la ramificación Hep III: Glu-Gal-Gal o Glu-Gal-Neu5Ac-Neu5Ac. Además, la molécula de LOS de HiNT375 presenta PCho en la primera glucosa de la ramificación Hep I. Las características completas de las cepas mutantes empleadas se presentan en la **Tabla 1 (ANEXO I)** y se resumen en la **Tabla 11**.

Mediante el empleo de estas cepas, se analizaron dos fenotipos asociados a la virulencia de HiNT, la resistencia del patógeno al ataque bactericida de los péptidos antimicrobianos y la formación de biopelículas sobre superficies abióticas.

Tabla 11. Características de los mutantes en genes que codifican enzimas responsables de la síntesis de LOS de HiNT empleadas en este trabajo.

Cepa	Estructura LOS
HiNT375	Cepa silvestre, estructura mostrada en Fig. 9
HiNT375 Δ <i>lgtF</i>	Cepa carente de ramificación oligosacarídica en Hep I
HiNT375 Δ <i>psA</i>	Cepa carente de ramificación oligosacarídica en Hep III
HiNT375 Δ <i>lgtF</i> Δ <i>psA</i>	Cepa carente de ramificaciones oligosacarídicas en Hep I y Hep III
HiNT375 Δ <i>opsX</i>	Cepa carente de las Hep I, II y III.
HiNT375 Δ <i>lic1BC</i>	Cepa carente de PCho
HiNT375 Δ <i>lic2A</i>	Cepa carente de digalactosa
HiNT375 Δ <i>siaB</i>	Cepa carente de ácido siálico
HiNT375 Δ <i>lgtF</i> -c	Complementación cromosómica de la cepa HiNT375 Δ <i>lgtF</i>
HiNT375 Δ <i>lic1BC</i> -c	Complementación cromosómica de la cepa HiNT375 Δ <i>lic1BC</i>
HiNT375 Δ <i>lic2A</i> -c	Complementación cromosómica de la cepa HiNT375 Δ <i>lic2A</i>

1.2.1. Contribución relativa de sustituciones del LOS a la resistencia de HiNT al ataque bactericida de péptidos antimicrobianos

Se analizó la supervivencia de las cepas descritas en la **Tabla 11** a polimixina B. Cada cepa fue incubada con un rango de concentraciones crecientes de polimixina B durante 60 min. Se analizó la supervivencia bacteriana frente a las distintas concentraciones de polimixina B, comparada con el número de bacterias en ausencia de polimixina B. Los resultados se muestran en % de supervivencia con respecto al control (ausencia de péptido). La sustitución PCho está implicada en la resistencia de HiNT a péptidos antimicrobianos (Lysenko *et al.*, 2000a). Como era previsible, el mutante HiNT375 Δ *lic1BC* fue más susceptible a polimixina B que la cepa silvestre HiNT375. Asimismo, al analizar HiNT375 Δ *lic1BC*-c, cepa en la que la ausencia de PCho está complementada, se restauró el nivel de resistencia a polimixina B a niveles similares a los de la cepa silvestre (**Tabla 12**). El transportador Sap está ligado a resistencia frente PAs en HiNT (Shelton *et al.*, 2011). Para comparar la contribución de PCho y Sap a la resistencia de HiNT frente a PAs, se analizó la supervivencia de HiNT375 Δ *sap* en presencia de concentraciones crecientes de polimixina B. HiNT375 Δ *lic1BC* y HiNT375 Δ *sap* mostraron niveles de susceptibilidad frente a polimixina B similares, en ambos casos menores al de la cepa silvestre (**Tabla 12**). Por el contrario, el mutante HiNT375 Δ *siaB* no mostró cambios significativos en su resistencia frente a polimixina B respecto a la cepa silvestre, excluyendo un papel del ácido siálico en la resistencia de HiNT a PAs. HiNT375 Δ *lic2A* mostró una ligera mayor sensibilidad a polimixina B que la cepa silvestre, que fue restaurada a los niveles de la cepa silvestre en la cepa complementada HiNT375 Δ *lic2A*-c (**Tabla 12**). Los mutantes HiNT375 Δ *lgtF* y HiNT375 Δ *psA* mostraron niveles de susceptibilidad a polimixina B mayores a los de la cepa silvestre, sugiriendo que las ramificaciones a partir de las Hep I y III del LOS de HiNT375 están implicadas en la resistencia bacteriana a PAs (**Tabla 12**). Confirmando esta hipótesis, HiNT375 Δ *lgtF* Δ *psA* y HiNT375 Δ *opsX* mostraron los niveles más bajos de resistencia a polimixina B del conjunto de mutantes analizados.

A continuación, se analizó la resistencia bacteriana al péptido natural β -defensina 1. Se empleó β -defensina 1 0.5 μ g/ml y se cuantificó la supervivencia de cada cepa tras incubación con el péptido durante 60 min. Los resultados obtenidos, mostrados en la **Tabla 13**, fueron comparables a los obtenidos al ensayar la resistencia bacteriana a polimixina B. HiNT375 Δ *lic1BC* fue más susceptible a β -defensina 1 que la cepa silvestre, mostrando una sensibilidad comparable a la de HiNT375 Δ *sap*. La susceptibilidad de HiNT375 Δ *lic1BC* fue restaurada al nivel de la cepa silvestre al complementar la mutación, cepa HiNT375 Δ *lic1BC*-c. HiNT375 Δ *siaB*

mostró niveles de resistencia a β -defensina 1 similares a la cepa silvestre. HiNT375 Δ *lic2A* mostró un ligero descenso en la resistencia frente a β -defensina 1, que fue restaurado a niveles de la cepa silvestre cuando la mutación fue complementada. HiNT375 Δ *lgtF* y HiNT375 Δ *lpsA* mostraron un ligero descenso en la resistencia frente a β -defensina 1, similar al obtenido por la cepa HiNT375 Δ *lic2A*. Este descenso fue restaurado a niveles de la cepa silvestre en la cepa complementada HiNT375 Δ *lgtF*-c. HiNT375 Δ *lgtF* Δ *lpsA* y HiNT375 Δ *opsX* mostraron niveles de resistencia a β -defensina 1 más bajos que los mutantes menos truncados y que la cepa silvestre.

Tabla 12. Resistencia a polimixina B de cepas mutantes generadas a partir de HiNT375 en las que la molécula LOS está truncada a distintos niveles. Las dosis de polimixina B empleadas se muestran en μ g/ml. Los resultados están expresados en % de supervivencia con respecto al control (ausencia de péptido).

Cepa HiNT	1	0.75	0.5	0.25	0.125	0
HiNT375	1.2 \pm 0.7	7.7 \pm 1.7	89.3 \pm 7.8	99.1 \pm 0.8	97.6 \pm 2.1	100
HiNT Δ <i>sapA</i>	0	0	48.3 \pm 8.6	81.8 \pm 2.5	96.6 \pm 2.9	100
HiNT Δ <i>siaB</i>	0	5.4 \pm 4.9	90.8 \pm 8.3	95.7 \pm 0.9	98.2 \pm 1.3	100
HiNT Δ <i>lic2A</i>	0.6 \pm 0.5	4.4 \pm 2.2	67.7 \pm 2.9	88.4 \pm 1.1	97.4 \pm 2.2	100
HiNT Δ <i>lic2A</i> -c	5.2 \pm 2.8	8.6 \pm 2.9	93.9 \pm 2.2	100	100	100
HiNT Δ <i>lic1BC</i>	0	0.6 \pm 0.4	55.9 \pm 3.9	88.7 \pm 3.5	99.6 \pm 0.2	100
HiNT Δ <i>lic1BC</i> -c	6.5 \pm 1.2	13.9 \pm 6.8	94 \pm 4.1	94.5 \pm 5.2	97.3 \pm 2.4	100
HiNT Δ <i>lgtF</i>	4.4 \pm 2.9	10.2 \pm 8.2	57.2 \pm 13.8	64.3 \pm 5.2	92.8 \pm 6.7	100
HiNT Δ <i>lgtF</i> -c	6.1 \pm 4.7	10 \pm 3.1	96.6 \pm 2.8	100	100	100
HiNT Δ <i>lpsA</i>	0	1.3 \pm 1.1	80.5 \pm 3.7	89.9 \pm 5.7	91.3 \pm 8.4	100
Δ <i>lgtF</i> Δ <i>lpsA</i>	0	0	24.6 \pm 3.6	76.8 \pm 6.3	92.6 \pm 0.9	100
Δ <i>opsX</i>	0	0	3.3 \pm 2.9	9.4 \pm 7.7	13.4 \pm 5.2	100

Estos resultados sugieren que PCho y digalactosa, pero no el ácido siálico, están implicados en la resistencia bacteriana frente a péptidos antimicrobianos. Asimismo, establecemos una correlación entre el grado de truncamiento del LOS y la sensibilidad de HiNT a PAs.

Tabla 13. Resistencia a β -defensina 1 de cepas mutantes generadas a partir de HiNT375 en las que la molécula LOS está truncada a distintos niveles. Los resultados están expresados en % de supervivencia con respecto al control (ausencia de péptido).

Cepa	β -defensina 1 (0.5 μ g/ml)
HiNT375	100
HiNT375 Δ sapA	60,3 \pm 4,1
HiNT375 Δ siaB	97,8 \pm 1,8
HiNT375 Δ lic2A	76,2 \pm 4,4
HiNT375 Δ lic2A-c	98,5 \pm 1
HiNT375 Δ lic1BC	42,1 \pm 6,3
HiNT375 Δ lic1BC-c	91,7 \pm 5,2
HiNT375 Δ lgtF	60,5 \pm 6,5
HiNT375 Δ lgtF-c	99,7 \pm 0,1
HiNT375 Δ lgtF Δ lpsA	33,2 \pm 7,7
HiNT375 Δ opsX	20 \pm 1.8

1.2.2. Contribución relativa de sustituciones del LOS de HiNT a la formación de biopelículas sobre superficies abióticas

Se analizó la contribución relativa de las sustituciones oligosacarídicas presentes en el LOS de la cepa HiNT375 a la formación de biopelículas. Para ello, empleamos microfermentadores de flujo continuo. El análisis de los datos se hizo como sigue: (i) análisis cualitativo, se visualizó de forma macroscópica la formación de biopelícula en el microfermentador, así como la densidad bacteriana de la biopelícula formada sobre la espátula de vidrio (**Fig. 18**); (ii) análisis cuantitativo, la biopelícula formada se desprendió de la espátula y paredes del microfermentador mediante agitación suave, generándose una suspensión bacteriana en PBS cuya DO_{600nm} fue cuantificada (**Tabla 14**); (iii) análisis comparativo entre cepas, la DO₆₀₀ de la suspensión bacteriana correspondiente a la cepa silvestre se consideró 100% de formación de biopelícula, y se empleó como referencia para el cálculo de la formación relativa de biopelícula por las cepas mutantes analizadas (**Fig. 18**).

La biopelícula formada por HiNT375 Δ lic1BC y HiNT375 Δ siaB fue significativamente menor a la formada por la cepa silvestre (**Tabla 14**). La complementación de PCho restauró la capacidad de formación de biopelícula, tal y como se observa en la cepa HiNT375 Δ lic1BC-c. La formación de biopelícula por el mutante HiNT375 Δ lic2A fue similar a la cepa silvestre, excluyendo un posible papel de la digalactosa en la formación de biopelículas. HiNT375 Δ lgtF y HiNT375 Δ lgtF Δ lpsA mostraron una capacidad de formación de biopelícula menor que la cepa silvestre, no

apreciándose diferencias entre cepas. En cambio, HiNT375Δ*psA* mostró una capacidad de formación de biopelícula similar a la de la cepa silvestre. De forma inesperada, HiNT375Δ*opsX* formó una biopelícula similar a la de la cepa silvestre.

En conjunto, estos resultados muestran que PCho y el ácido siálico, pero no la digalactosa, están implicados en la formación de biopelículas por HiNT.

Tabla 14. Formación de biopelículas de cepas mutantes generadas a partir de HiNT375 en las que la molécula LOS está truncada a distintos niveles. La biopelícula formada se desprendió de la espátula y paredes del microfermentador mediante agitación suave, generándose una suspensión bacteriana en PBS cuya DO_{600nm} fue cuantificada.

Cepa	DO _{600nm}
HiNT375	1.82±0.28
HiNT375Δ <i>siaB</i>	0.92±0.22
HiNT375Δ <i>lic2A</i>	1.48±0.14
HiNT375Δ <i>lic1BC</i>	0.99±0.47
HiNT375Δ <i>lic1BC-c</i>	1.58±0.07
HiNT375Δ <i>lgtF</i>	0.91±0.39
HiNT375Δ <i>lgtF-c</i>	1.57±0.16
HiNT375Δ <i>psA</i>	1.71±0.31
HiNT375Δ <i>lgtF</i> Δ <i>psA</i>	1.08±0.35
HiNT375Δ <i>opsX</i>	1.90±0.05

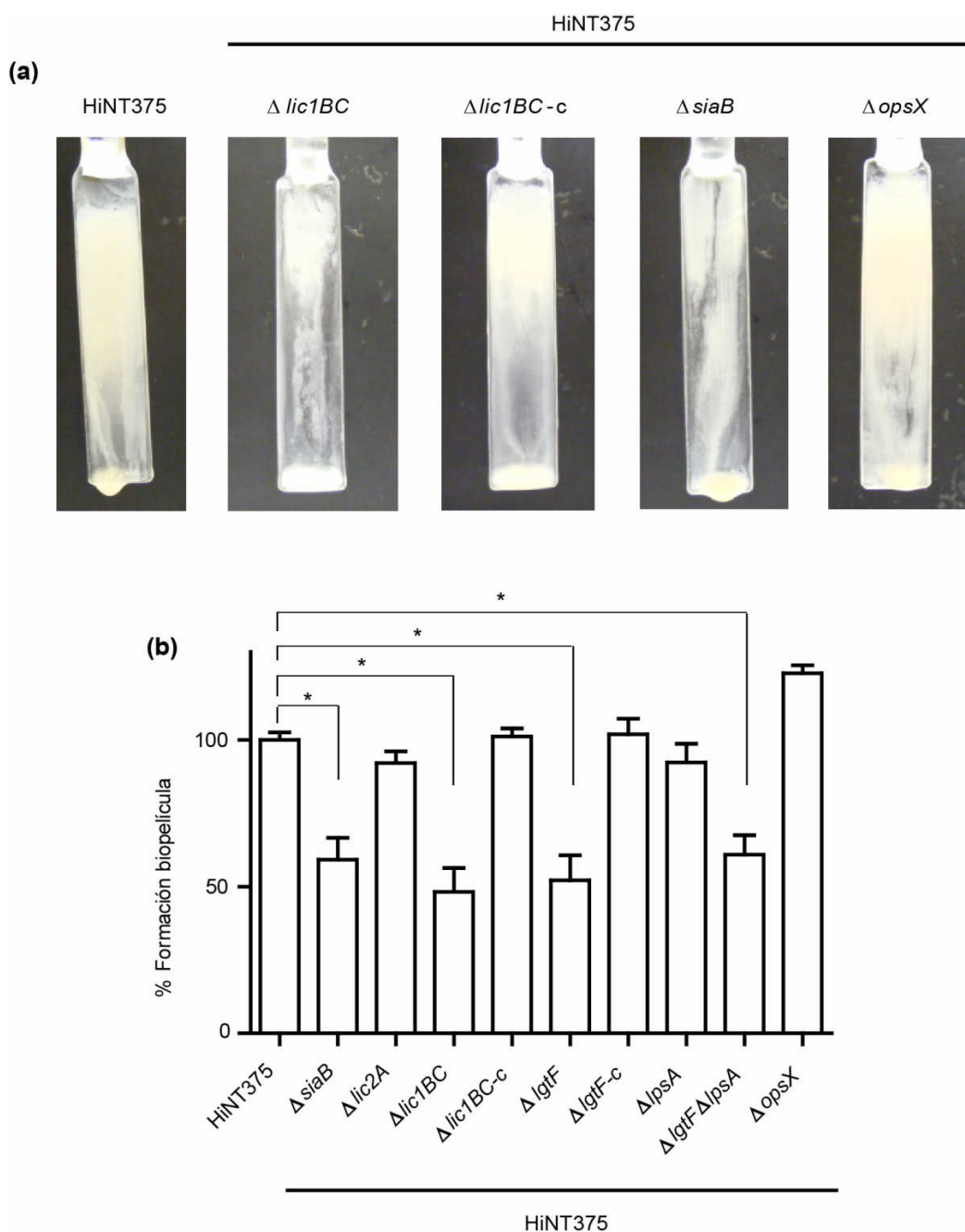


Figura 18. Contribución relativa de sustituciones oligosacáridicas del LOS de HiNT a la formación de biopelículas. Se usó un microfermentador de vidrio de 60 ml con un flujo continuo de 40 ml/h de sBHI en constante aireación con aire estéril a presión (0.3 bar). La espátula que contiene el microfermentador sirve como soporte abiótico para el crecimiento bacteriano. En cada experimento, se emplearon simultáneamente seis microfermentadores. (a) La biopelícula formada en cada espátula fue fotografiada, se muestran imágenes representativas de la biopelícula formada por cinco de las cepas analizadas. (b) Cuantificación y comparación de la formación de biopelículas entre cepas. Las biopelículas fueron resuspendidas en PBS y se cuantificó la turbidez de cada suspensión a DO_{600nm} . La turbidez obtenida al analizar la cepa silvestre se consideró como 100% y fue empleada para establecer la capacidad relativa de los mutantes testados para forma biopelículas. Cada cepa bacteriana fue analizada por duplicado en al menos tres experimentos independientes ($n \geq 6$).

CAPÍTULO 2: DISECCIÓN DE LOS MECANISMOS DE SUBVERSIÓN CELULAR Y DE LA CONTRIBUCIÓN RELATIVA DE ADHESINAS BACTERIANAS DURANTE LA INFECCIÓN POR EL PATÓGENO RESPIRATORIO HiNT

2.1. Contribución de las balsas lipídicas, integrinas, quinasas, GTPasas, señalización dependiente de PI3K-Akt y [AMPc] a la infección del epitelio respiratorio humano por HiNT.

Como se ha señalado en el apartado 3.5.2 de la sección Introducción, el modelo de infección del epitelio respiratorio humano por HiNT que consideramos actualmente presenta cuatro etapas: (i) adhesión bacteriana a la superficie celular, en un proceso mediado por un repertorio de adhesinas bacterianas y receptores eucariotas; (ii) agregación bacteriana y formación de microcolonias; (iii) invasión bacteriana; (iv) localización intracelular no proliferativa (**Fig. 11**).

Durante esta Tesis Doctoral, hemos profundizado en los mecanismos moleculares implicados en la invasión epitelial por HiNT. Hemos analizado el papel de un conjunto de moléculas de la célula hospedadora en la adhesión e invasión del epitelio respiratorio humano por HiNT. Para ello, empleamos como modelo experimental la línea celular de neumocito tipo II humano A549 y la cepa HiNT375. Las estructuras y procesos celulares analizados son: (i) balsas lipídicas, caveolina y clatrina; (ii) señalización PI3K-Akt; (iii) integrinas; (iv) quinasas; (v) GTPasas; (vi) AMP cíclico citosólico.

Salvo que se indique lo contrario, todos los experimentos se realizaron empleando los protocolos de infección y determinación de la adhesión e invasión bacteriana descritos en el apartado 11 de la sección Materiales y Métodos.

2.1.1. Observación de la adhesión e invasión epitelial por HiNT mediante microscopía electrónica de barrido.

Para el estudio de la interacción entre HiNT y el epitelio respiratorio humano, se utilizó como modelo experimental la línea celular de neumocito de tipo II humano A549. Se infectaron células A549 con la cepa HiNT375, con una multiplicidad de infección de 100:1. El tiempo de contacto fue de 2 h. La adhesión e invasión de HiNT375 a células A549 se analizó mediante microscopía electrónica de barrido. La **Figura 19** muestra una imagen representativa de una célula infectada. Se observan bacterias adheridas a la superficie epitelial y/o en vías de internalización. Se observa una unión íntima de las bacterias a la superficie epitelial, posiblemente mediada a través de la interacción específica entre ligando(s) bacterianos y receptor(es)

eucariotas. Esta parte del trabajo se ha realizado en colaboración con el Dr. José Ramos Vivas (Fundación Hospital Marqués de Valdecilla, Santander).

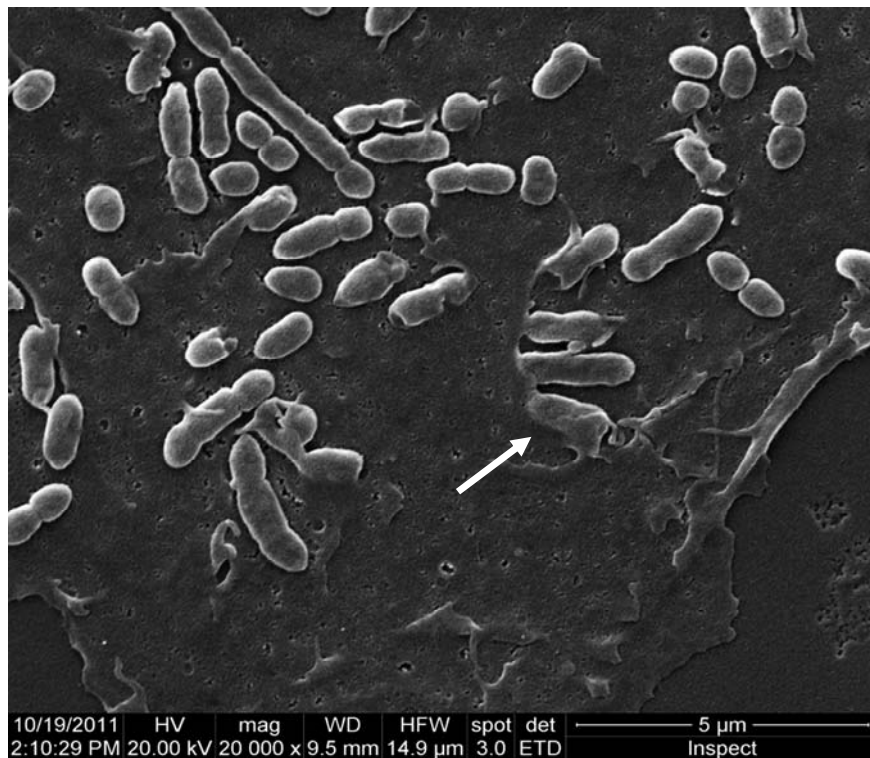


Figura 19. Imagen de microscopía electrónica de barrido mostrando la adhesión de HiNT375 a células del epitelio respiratorio humano A549. La flecha muestra una bacteria adherida a la superficie epitelial y en vías de internalización.

2.1.2. Papel de balsas lipídicas, caveolina y clatrina en la invasión del epitelio respiratorio humano por HiNT

Las balsas lipídicas son microdominios dinámicos de la membrana eucariota enriquecidos en colesterol, esfingolípidos y varios tipos de proteínas, incluyendo caveolinas 1, 2 y 3, flotilina y proteínas de anclaje glicosilfosfatidilinositol (del inglés *GPI anchored proteins*). Estudios previos realizados en nuestro laboratorio indicaron que la depleción de colesterol de las balsas lipídicas mediante el tratamiento de células A549 con metil- β -ciclodextrina, M β CD, reduce significativamente la invasión de la cepa HiNT375, sin modificar la tasa de adhesión bacteriana (Morey *et al.*, 2011). Tomando esta observación como punto de partida, se procedió a la depleción y posterior restauración del colesterol de la membrana plasmática eucariota mediante tratamiento celular con M β CD y posterior adición de SBF 20% durante 3 h. A continuación, las células se infectaron con HiNT375 y se determinó el nivel de invasión bacteriano. La invasión epitelial de HiNT375 se restauró a un nivel comparable al

obtenido al emplear células control (CON) no tratadas (**Fig. 20a**). Dado que las balsas lipídicas son regiones dinámicas de la membrana eucariota, se analizó el posible efecto de cambios en la movilidad de estos microdominios en la invasión de HiNT375. La temperatura es un parámetro que afecta a la fluidez de las membranas y la movilidad de las proteínas presentes en ellas (Hoffmann *et al.*, 2010). Por ello, se modificó la temperatura de incubación de las células y se procedió a su infección con HiNT375. La incubación de las células a 41°C durante 24 h antes de la infección bacteriana aumentó el nivel de invasión de HiNT375. Sin embargo, la incubación celular a 33°C no modificó el nivel de invasión de HiNT375, en comparación a los resultados obtenidos con células incubadas a 37°C (**Fig. 20b**). El aumento de temperatura está asociado a un aumento de fluidez de la membrana (Hoffmann *et al.*, 2010), por lo que la mayor invasión observada al incubar las células a 41°C sugiere que el aumento de la fluidez de las membranas favorece la invasión epitelial por HiNT. La adhesión bacteriana fue similar en los tres casos, independientemente de la temperatura de incubación de las células (**Fig. 20c**).

El gangliósido es un componente de las balsas lipídicas. Algunos patógenos utilizan gangliósido GM1 para internalizarse en la célula hospedadora (Watarai *et al.*, 2002). Para analizar el papel del gangliósido GM1 en la internalización de HiNT375, las células A549 se infectaron con HiNT375 durante 30 y 120 min, se fijaron con PFA y se tiñeron con toxina B de *Vibrio cholerae* conjugado a Texas Red, un marcador del gangliósido GM1. El análisis mediante microscopía confocal mostró que el gangliósido GM1 co-localiza con HiNT375 (**Fig. 21**). La co-localización GM1-bacteria fue cuantificada mediante recuento de eventos observados con el microscopio confocal, observándose un 28.9% de co-localización tras 30 min de infección y un 27.5% tras 120 min de infección epitelial.

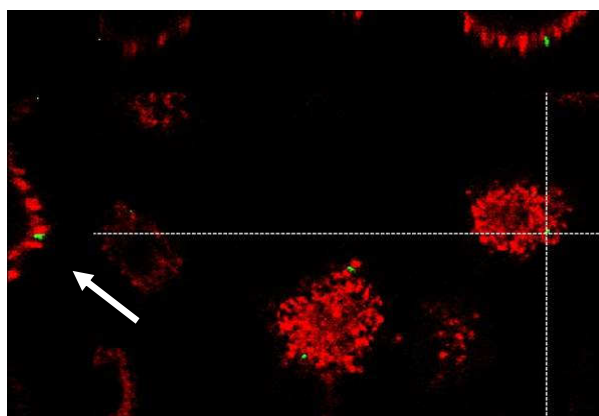


Figura 21. HiNT375 co-localiza con el gangliósido GM1. Imagen de microscopía confocal en donde se observa co-localización de HiNT375, en verde, con el gangliósido GM1, en rojo.

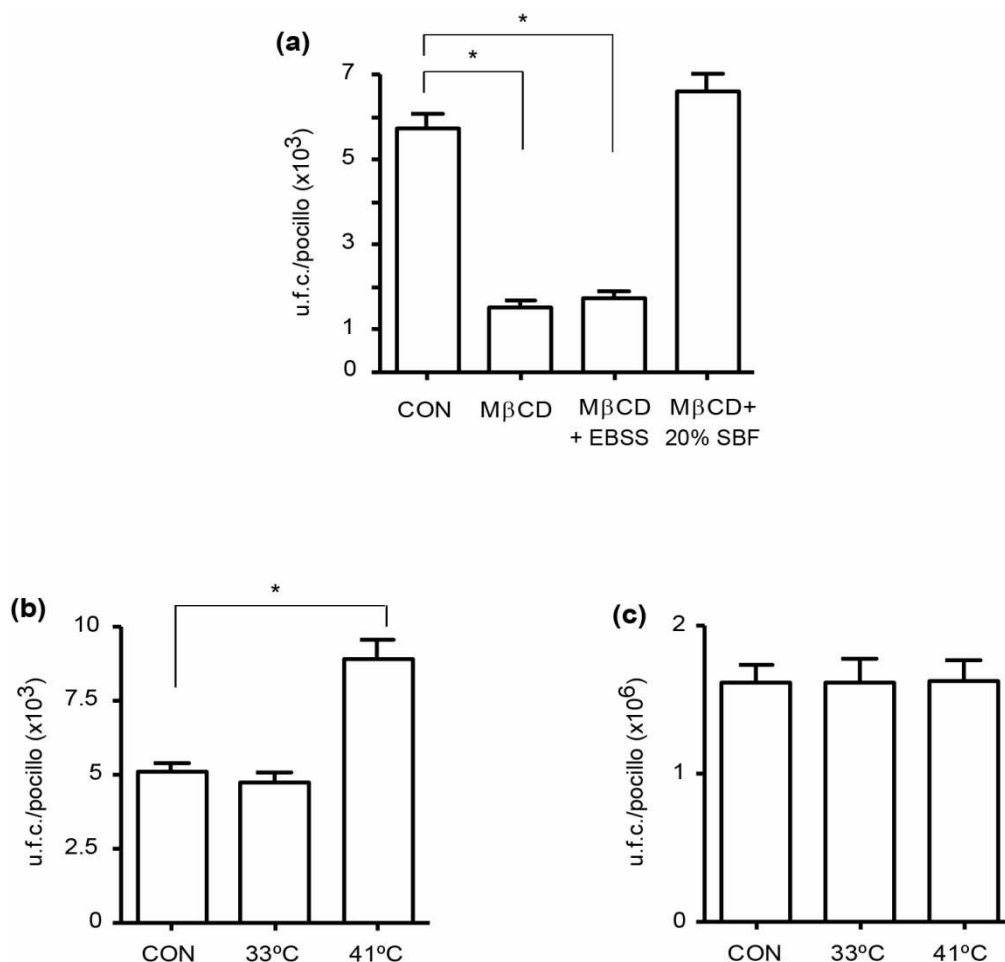


Figura 20. Papel de las balsas lipídicas en la invasión de células A549 por HiNT375. (a) Efecto de la depleción y posterior restauración del colesterol en la infección epitelial por HiNT375. Las células A549 fueron pretratadas con M β CD. Posteriormente, se incubaron con EBSS o con SBF 20%, se infectaron con HiNT375, y se cuantificó la tasa de invasión bacteriana. Los resultados se expresan en u.f.c./pocillo. (b) La movilidad de las balsas lipídicas modula la invasión de HiNT. Las células A549 se incubaron a 37°C (CON, control), 33°C (movilidad proteica reducida) y 41°C (mayor proteica movilidad) y se infectaron con HiNT375 a 37°C. Se determinó la tasa de invasión bacteriana. (c) La movilidad de las balsas lipídicas no modula la adhesión de HiNT. Las células A549 se incubaron como en (b). Se determinó la tasa de adhesión bacteriana.

A continuación, se analizó el papel de la proteína caveolina-1 (cav-1) en la invasión de células A549 por HiNT375. Las células fueron transfectadas de forma independiente con dos dsARNi específicos de cav-1, CAV1^a y CAV1^b. Las células se infectaron 48 h después de la transfección. La tasa de invasión bacteriana fue inferior a la observada en células transfectadas con el dsARNi control AllStars (AS-CON) (**Fig. 22a**), si bien la interferencia de cav-1 no modificó la adhesión de HiNT375 a células A549 (**Fig. 23a**). La disminución de los niveles de cav-1 debido a la interferencia se monitorizó mediante *Western blot*, utilizando un anticuerpo primario ratón anti-caveolina y un anticuerpo secundario conejo anti-ratón-HRP (**Fig. 22b**). Por otra parte, existen evidencias que apuntan al papel de cav-1 como un regulador negativo en la endocitosis mediada por caveola (Le *et al.*, 2002). Estas evidencias nos llevaron a analizar el efecto de la sobreexpresión de cav-1 en la invasión del epitelio respiratorio por HiNT375. Para ello, las células A549 fueron transfectadas de forma transitoria con un vector que expresa cav-1-GFP (pCav-GFP), e infectadas con HiNT375. La invasión bacteriana fue menor en células transfectadas en las que se sobreexpresó cav-1 que en células control no transfectadas (**Fig. 22c**). La sobreexpresión de cav-1 no modificó la tasa de adhesión bacteriana a células A549 (**Fig. 23b**). La sobreexpresión de los niveles de cav-1-GFP se monitorizó mediante *Western blot*, utilizando un anticuerpo primario ratón anti-GFP y un anticuerpo secundario conejo anti-ratón-HRP (**Fig. 22d**).

La endocitosis mediada por caveolina es un proceso dependiente de la GTPasa dinamina (Echarri *et al.*, 2007; Nichols, 2003). Se examinó la implicación de dinamina en la invasión epitelial por HiNT375. Esta GTPasa fue inactivada mediante pretratamiento de células A549 con el inhibidor químico dynasore, lo que redujo la tasa de invasión bacteriana respecto a la observada en células control (**Fig. 22e**). La adhesión bacteriana no se vio alterada como consecuencia del bloqueo de dinamina (**Fig. 23c**). Dinamina también participa en el proceso de endocitosis mediada por clatrina. Asimismo, existen evidencias que indican que algunos patógenos bacterianos invaden células epiteliales mediante un proceso dependiente de clatrina (Veiga & Cossart, 2005; Veiga *et al.*, 2007). En base a estas observaciones, se analizó el papel de clatrina en la invasión de células A549 por HiNT. Las células A549 se transfectaron con un *pool* de cuatro dsARNi para interferir clatrina. La invasión de HiNT375 en las células en las que se interfirió clatrina fue mayor a la observada en células control transfectadas con dsARNi AllStars (**Fig. 22f**). La adhesión bacteriana no se vio alterada al interferir clatrina (**Fig. 23d**). La efectividad de la interferencia de clatrina se monitorizó mediante *Western blot*, utilizando un anticuerpo primario conejo anti-clatrina y un anticuerpo secundario ratón anti-conejo-HRP (**Fig. 22g**).

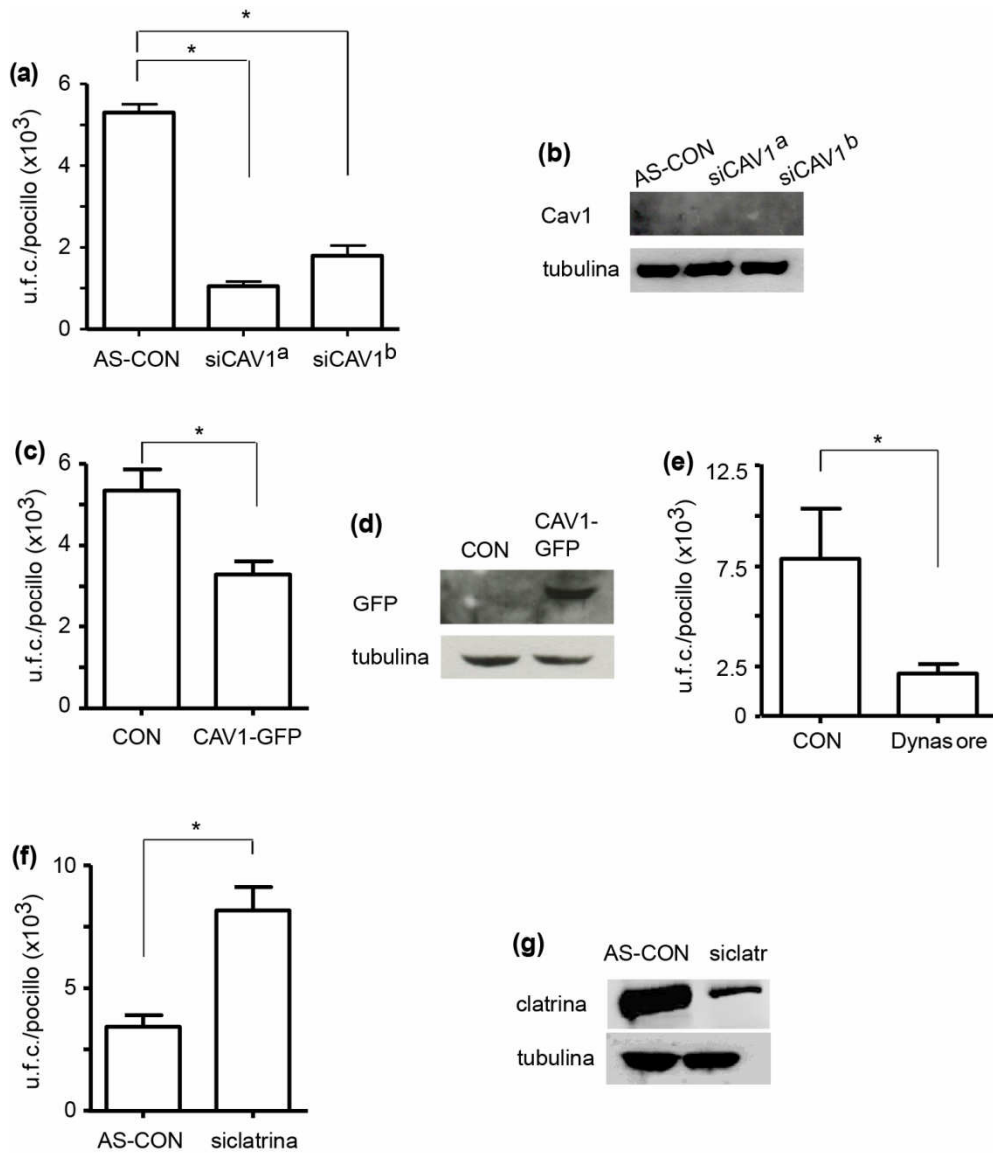


Figura 22. Papel de caveolina-1, dinamina y clatrina en la invasión epitelial por HiNT375.

(a) Caveolina-1 fue interferida en células A549 con dsARNi CAV1^a y CAV1^b; las células se infectaron con HiNT375 y se cuantificó la tasa de internalización bacteriana. (b) Monitorización de la interferencia de caveolina mediante *Western blot* anti-caveolina (panel superior). El control de carga se realizó mediante inmunodetección de tubulina (panel inferior). (c) Caveolina-1 fue sobreexpresada en células A549 mediante transfección transitoria con pCAV1-GFP; las células se infectaron con HiNT375 y se cuantificó la invasión bacteriana. (d) Monitorización de la sobreexpresión de caveolina-1 en células transfectadas con pCAV1-GFP mediante *Western blot* anti-GFP (panel superior). El control de carga se realizó mediante inmunodetección de tubulina (panel inferior). (e) Implicación de las GTPasas dinamina 1 y 2 en la internalización de HiNT. Las células A549 se pretrataron con dynasore y se infectaron con HiNT375. (f) Clatrina previene la invasión por HiNT. Clatrina fue interferida en células A549 con dsARNi clatrina; las células se infectaron con HiNT375 y se cuantificó la internalización bacteriana. (g) Monitorización de la interferencia de clatrina mediante *Western blot* anti-clatrina (panel superior). El control de carga se realizó mediante inmunodetección de tubulina (panel inferior).

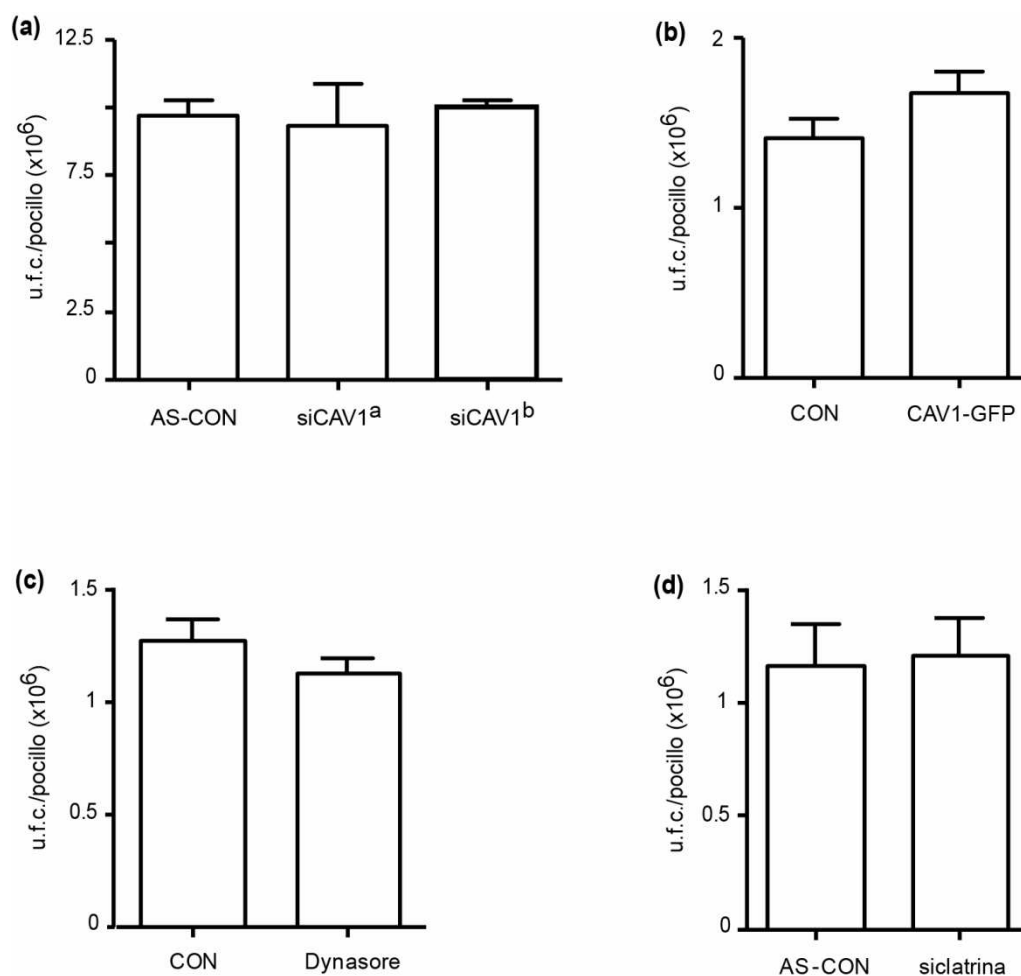


Figura 23. Papel de caveolina-1, dinamina y clatrina en la adhesión de células A549 por HiNT375. (a) Caveolina-1 fue interferida en células A549 con dsARNi CAV1^a y CAV1^b; las células se infectaron con HiNT375 y se cuantificó la tasa de adhesión bacteriana. (b) Caveolina-1 fue sobreexpresada en células A549 mediante transfección transitoria con pCAV1-GFP; las células se infectaron con HiNT375 y se cuantificó la adhesión bacteriana. (c) Implicación de las GTPasas dinamina 1 y 2 en la adhesión epitelial de HiNT. Las células A549 se pretrataron con dynasore y se infectaron con HiNT375. (d) Clatrina no modula la adhesión epitelial de HiNT. Clatrina fue interferida en células A549 con dsARNi clatrina; las células se infectaron con HiNT375 y se cuantificó la adhesión bacteriana.

Estos datos muestran que caveolina-1, dinamina y clatrina participan en la invasión epitelial por HiNT375, jugando un papel antagónico en dicho proceso. Este evento requiere la integridad de los microdominios de la membrana plasmática de la célula hospedadora.

2.1.3. La actividad Akt es importante en la invasión del epitelio respiratorio humano por HiNT

PI3K cataliza la conversión de $\text{PtdIns}(4,5)\text{P}_2$ en $\text{PtdIns}(3,4,5)\text{P}_3$. Estudios previos realizados en nuestro laboratorio indicaron que la inactivación de PI3K mediante el tratamiento de células A549 con los inhibidores químicos LY294002 y wortmanina reduce significativamente la tasa de invasión de HiNT375, sin modificar los niveles de adhesión bacteriana (Morey *et al.*, 2011). Por otra parte, la infección de células A549 con HiNT estimula la fosforilación y consiguiente activación de la serina-treonina quinasa Akt, y esta fosforilación es dependiente de la actividad PI3K (Morey *et al.*, 2011). Tomando estas observaciones como punto de partida, se examinó la implicación de Akt en la invasión del epitelio respiratorio por HiNT375. Akt fue inactivado mediante pretratamiento de células A549 con Akti VIII, un inhibidor selectivo de las isoformas Akt-1 y Akt-2. Este bloqueo redujo la tasa de invasión bacteriana con respecto a la observada en células control no tratadas (CON) (**Fig. 24a**). La adhesión bacteriana no se vio alterada por el bloqueo de Akt (**Fig. 24b**).

Fosfolipasa C- γ (PLC- γ) es otro efector de PI3K (Uliczka *et al.*, 2009). Se examinó la implicación de PLC- γ en la invasión del epitelio respiratorio por HiNT375. PLC- γ fue inactivado mediante pretratamiento de células A549 con el inhibidor químico U73122, lo que aumentó significativamente la tasa de invasión bacteriana respecto a la observada en células control. La adhesión bacteriana no se vio alterada por el bloqueo de PLC- γ (**Fig. 24c**). PLC- γ hidroliza $\text{PtdIns}(4,5)\text{P}_2$, generando IP_3 y DAG (Uliczka *et al.*, 2009). DAG recluta proteína quinasa C (PKC). Se analizó el papel de PKC en la invasión de HiNT375. Para ello, las células se trataron con tres inhibidores de PKC, Gö6983, Calphostin C y GF109203X. El tratamiento independiente con los tres inhibidores no modificó la adhesión ni la invasión de células A549 por HiNT375, respecto a los niveles obtenidos en células no tratadas (**Fig. 24d**).

Estos datos muestran que la internalización de HiNT375 está facilitada por PI3K y sus efectores Akt y PLC, los cuales juegan un posible papel antagónico en la invasión epitelial por este patógeno respiratorio.

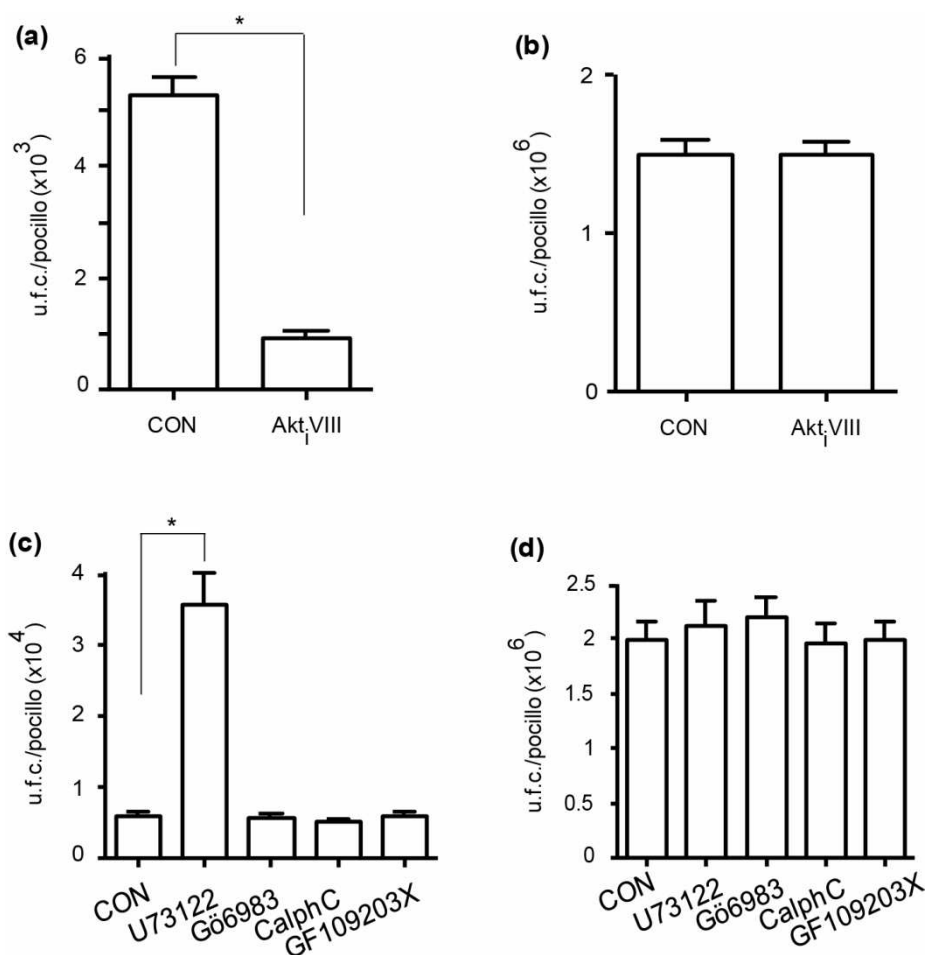


Figura 24. Papel de Akt y PLC- γ en la invasión de células A549 por HiNT375. Implicación de Akt en la infección epitelial por HiNT. (a) Las células A549 fueron pretratadas con el inhibidor Akti VIII, e infectadas con HiNT375. Se cuantificaron las tasas de invasión (a) y de adhesión (b) bacterianas en presencia o ausencia (CON) de Akti VIII. Implicación de PLC- γ y PKC en la infección epitelial por HiNT. PLC- γ , pero no PKC, previene la invasión epitelial por HiNT. Las células A549 fueron pretratadas con el inhibidor de PLC- γ U-73122, y con los inhibidores de PKC Gö6983, calphostin C y GF109203X, e infectadas con HiNT375. Se cuantificaron las tasas de invasión (c) y de adhesión (d) bacterianas en presencia o ausencia (CON) de cada inhibidor.

2.1.4. Las integrinas $\beta 1$ y $\alpha 5$ están implicadas en la invasión del epitelio respiratorio humano por HiNT

Las integrinas son sensores de la matriz extracelular cuya activación induce su dimerización, lo que conlleva el reclutamiento y activación de cascadas de señalización eucariota como PI3K-Akt (Caswell *et al.*, 2009; Huveneers & Danen, 2009). Habiendo establecido la importancia de PI3K-Akt en la invasión celular por HiNT375 (Morey *et al.*, 2011), analizamos el papel de las integrinas en este proceso. Las integrinas pueden ser activadas por cationes divalentes, en particular Mn^{2+} (Muenzner *et al.*, 2010). Las células A549 fueron tratadas con Mn^{2+} e infectadas con HiNT375, lo que determinó un incremento significativo de la invasión bacteriana respecto a la observada en células control no tratadas (**Fig. 25a**). La adhesión bacteriana no se vio alterada por el tratamiento con Mn^{2+} (**Fig. 26a**). Existen evidencias que indican que las células A549 expresan integrina $\beta 1$ (Guo *et al.*, 2009). Para analizar el papel de la integrina $\beta 1$ en la invasión epitelial por HiNT, las células A549 fueron incubadas de forma independiente con 3 anticuerpos anti-integrina $\beta 1$: (i) TS2/16, un anticuerpo activador de integrina $\beta 1$; (ii) Lia 1/2, un anticuerpo bloqueante de $\beta 1$; (iii) Alex 1/4, un anticuerpo control. La incubación de células A549 con TS2/16 provocó un aumento de la tasa de invasión de HiNT375, respecto a la observada en células control; la incubación celular con Lia 1/2 causó una disminución de la tasa de internalización bacteriana; la incubación celular con Alex 1/4 no modificó el nivel de invasión de HiNT375 (**Fig. 25b**). La adhesión de HiNT375 a células A549 fue similar en células control y en células tratadas con TS2/16, Lia 1/2 y Alex 1/4 (**Fig. 26b**). Para confirmar la implicación de integrina $\beta 1$ en la invasión del epitelio respiratorio por HiNT, las células A549 fueron transfectadas con un *pool* de dos dsARNi que reducen la expresión de integrina $\beta 1$, e infectadas con HiNT375 48 h posttransfección. La invasión de HiNT375 en células transfectadas con el *pool* de dsARNi de integrina $\beta 1$ fue menor a la observada en células transfectadas con el dsARNi control AllStars (AS-CON) (**Fig. 25c**). La adhesión bacteriana no se vio alterada al interferir integrina $\beta 1$ (**Fig. 26c**). La eficiencia de la interferencia de integrina $\beta 1$ se monitorizó mediante *Western blot*, utilizando un anticuerpo primario cabra anti-integrina $\beta 1$ y un anticuerpo secundario ratón anti-cabra-HRP (**Fig. 25c**). Asimismo, mediante microscopía de fluorescencia, se observó que HiNT375 colocaliza con integrina $\beta 1$ (**Fig. 25d**). Para ello, integrina $\beta 1$ se tiñó con un anticuerpo primario cabra anti- integrina $\beta 1$ y un anticuerpo secundario burro anti-cabra conjugado a Cy2.

A continuación, se analizó qué subunidad α de las integrinas está implicada en la invasión de células A549 por HiNT375. Se utilizaron de forma independiente los anticuerpos P1B5, P4C2 y PID6, que bloquean las subunidades integrina $\alpha 3$, $\alpha 4$ y $\alpha 5$, respectivamente. La incubación de células A549 con PID6 provocó una disminución de los niveles de adhesión e invasión de HiNT375. Mediante la utilización de tres concentraciones de anticuerpo, se observó que el bloqueo provocado por PID6 es un evento dependiente de la cantidad de anticuerpo empleada (**Figs. 25e y f**). Por el contrario, la incubación de células A549 con P1B5 y P4C2 no alteró los niveles de adhesión y/o invasión de HiNT375 (**Figs.**

26d y e). Estos resultados sugieren la implicación de integrina $\alpha 5$ en la infección epitelial por HiNT375. Para confirmar estos datos, las células A549 fueron incubadas con un péptido sintético que contiene la secuencia RGD. RGD es la secuencia a través de la cual la fibronectina se une a su ligando fisiológico integrina $\alpha 5$. De esta forma, si HiNT presenta ligando(s) de integrina $\alpha 5$, el péptido RGD competirá con el ligando bacteriano. La incubación de células A549 con el péptido RGD provocó una disminución de los niveles de adhesión e invasión de HiNT375. La utilización de tres concentraciones de péptido indicó que el bloqueo es un evento dependiente de la dosis de péptido (**Fig. 25g y h**).

En conjunto, estos resultados indican que las integrinas $\beta 1$ y $\alpha 5$ están implicadas en la invasión del epitelio respiratorio por HiNT. Además, los datos sugieren que HiNT375 presenta uno o varios ligandos de integrina $\alpha 5$, que puede ser un receptor de HiNT en el epitelio respiratorio.

2.1.5. Las tirosina quinasas están implicadas en la invasión del epitelio respiratorio por HiNT

La activación de las integrinas estimula varias cascadas de señalización que, a menudo, son iniciadas a través de tirosina quinasas como FAK y quinasas de la familia Src (Guarino, 2010; Mitra *et al.*, 2005). La activación de integrinas promueve la autofosforilación de FAK, lo que crea un sitio de unión de alta afinidad para Src. La unión Src-FAK estimula la actividad de Src que, a su vez, promueve la fosforilación y activación máxima de FAK. El complejo FAK-Src, una vez activado, recluta y/o fosforila proteínas adaptadoras y cascadas de señalización que modulan diversas funciones de la célula hospedadora, incluyendo PI3K-Akt (Guarino, 2010). Dada la implicación de las integrinas $\beta 1$ y $\alpha 5$ y de PI3K-Akt en la infección del epitelio respiratorio por HiNT, se analizó el papel de tirosina quinasas eucariotas en la invasión epitelial por HiNT.

Las células A549 se trataron con genisteína, un inhibidor general de tirosina quinasas, lo que provocó una reducción significativa de la invasión celular por HiNT375, comparado con los niveles de invasión en células control (**Fig. 27a**). A continuación, se analizó el efecto de PF-743228, un inhibidor específico de FAK. Este inhibidor también redujo la tasa de invasión bacteriana (**Fig. 27a**). Para confirmar la implicación de FAK en la invasión de células A549 por HiNT, las células se transfectaron de forma independiente con dos dsARNi que reducen la expresión de FAK, FAK^a y FAK^b, y se infectaron con HiNT375 48 h post-transfección. La invasión de HiNT375 en células transfectadas con dsARNi FAK^a y FAK^b fue menor que la observada en células control, transfectadas con dsARNi AllStars (AS-CON) (**Fig. 27c**). La eficacia de la interferencia de FAK se monitorizó mediante *Western blot*, utilizando un anticuerpo primario conejo anti-FAK y un anticuerpo secundario ratón anti-conejo-HRP (**Fig. 27e**).

Para analizar el papel de las tirosina quinasas de la familia Src en la invasión de células epiteliales por HiNT se usó PP2, un inhibidor específico de esta familia de tirosina quinasas. La exposición celular a PP2 redujo la tasa de invasión de HiNT375 (**Fig. 27a**). Como control, se usó PP3, un análogo estructural no funcional de PP2. La exposición celular a PP3 no modificó la invasión bacteriana (**Fig. 27a**). Para confirmar el papel de las tirosina quinasas de la familia Src en la invasión epitelial por HiNT, las células se transfectaron de forma transitoria con el vector pc-SrcK297M, que sobreexpresa una variante no activa de c-Src, y a continuación se infectaron con HiNT375. En estas condiciones, se observó una reducción de los niveles de invasión bacteriana, en comparación a los observados en células no transfectadas (**Fig. 28a**).

El bloqueo farmacológico, el bloqueo mediante dsARNi o mediante la expresión de variantes inactivas de Src no modificó los niveles de adhesión de HiNT375 a células A549, comparados con los observados al emplear células control no tratadas (**Figs. 27b-d y 28b**).

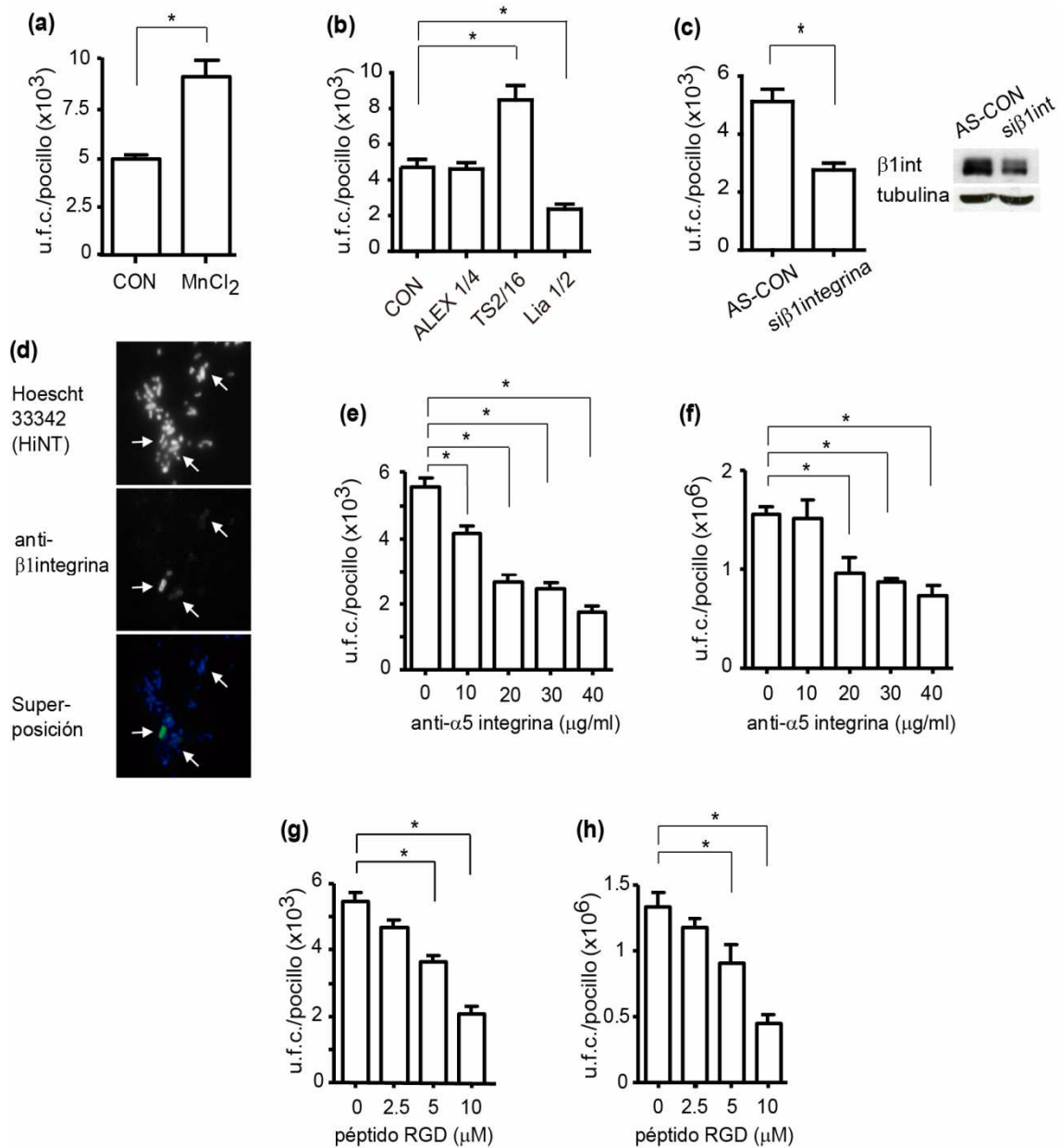


Figura 25. Papel de las integrinas en la invasión epitelial de HiNT375. Implicación de integrina $\beta 1$ en la infección epitelial por HiNT. **(a)** Las células A549 fueron pretratadas con Mn^{2+} e infectadas con HiNT375. Se cuantificó la tasa de invasión bacteriana en presencia o ausencia (CON) de $MnCl_2$. **(b)** Las células A549 fueron incubadas con anticuerpos anti-integrina $\beta 1$ activador (TS2/16), bloqueante (Lia 1/2) y control (Alex 1/4), e infectadas con HiNT375. Se cuantificó la tasa de invasión bacteriana en presencia o ausencia (CON) de anticuerpo. **(c)** Integrina $\beta 1$ fue interferida en células A549; las células se infectaron con HiNT375 y se cuantificó la invasión bacteriana. Derecha: monitorización de la interferencia de integrina $\beta 1$ mediante *Western blot* anti- integrina $\beta 1$ (panel superior). El control de carga se realizó mediante inmunodetección de tubulina (panel inferior). **(d)** Co-localización de HiNT375 con integrina $\beta 1$. Las bacterias se tiñeron con Hoechst 33342 (azul), integrina $\beta 1$ se tiñó con cabra anti-integrina $\beta 1$ y ratón anti-cabra conjugado con Cy2 (verde). La imagen es representativa de una infección de células A549 con HiNT375 durante 120 min. Implicación de integrina $\alpha 5$ en la infección epitelial por HiNT. Las células A549 fueron incubadas con concentraciones crecientes del anticuerpo bloqueante anti-integrina $\alpha 5$ PD16, e infectadas con HiNT375. Se cuantificaron las tasas de invasión **(e)** y adhesión **(f)** bacteriana. Las células A549 fueron incubadas con concentraciones crecientes del péptido RGD, e infectadas con HiNT375. Se cuantificaron las tasas de invasión **(g)** y adhesión **(h)** bacteriana.

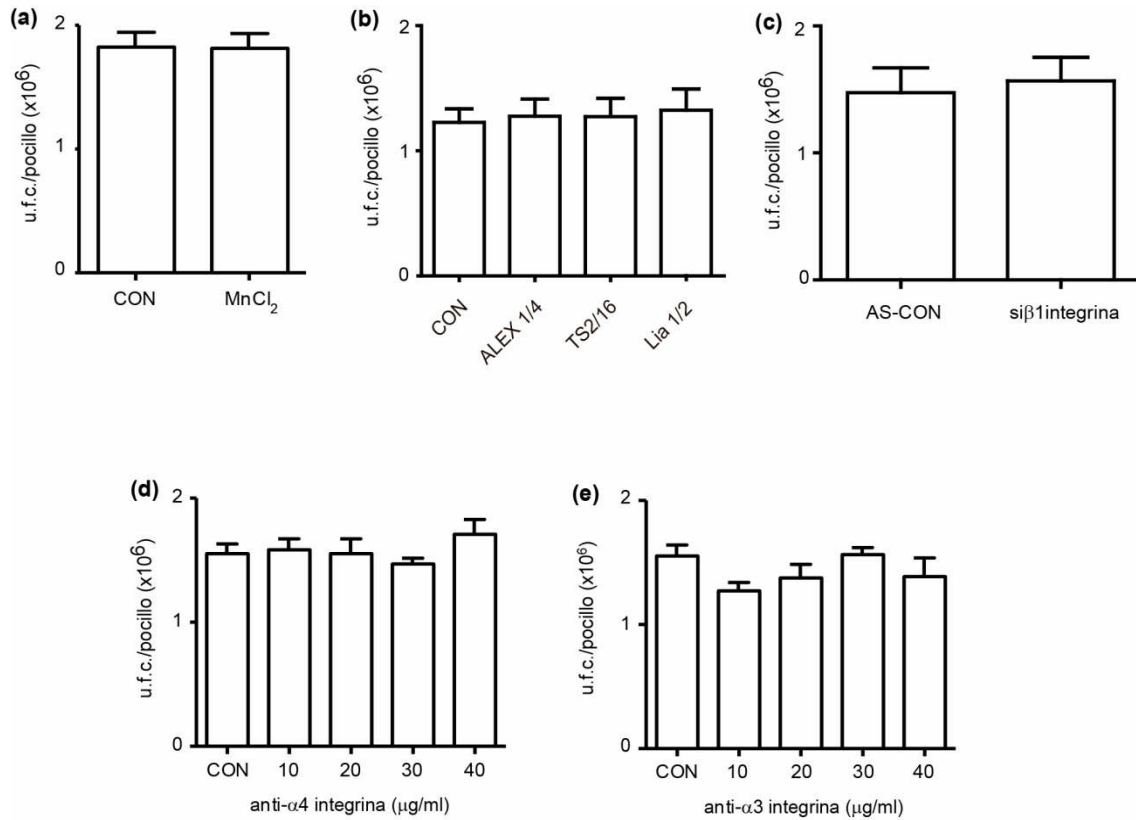


Figura 26. Papel de las integrinas en la adhesión de HiNT375 al epitelio respiratorio. Implicación de integrina β1 en la adhesión epitelial de HiNT. (a) Las células A549 fueron pretratadas con Mn²⁺, e infectadas con HiNT375. Se cuantificó la adhesión bacteriana en presencia o ausencia (CON) de MnCl₂. (b) Las células A549 fueron incubadas con anticuerpos anti-integrina β1 activador (TS2/16), bloqueante (Lia 1/2) y control (Alex 1/4), e infectadas con HiNT375. Se cuantificó la adhesión bacteriana en presencia o ausencia (CON) de anticuerpo. (c) Integrina β1 fue interferida en células A549; las células se infectaron con HiNT375 y se cuantificó la adhesión bacteriana. Ausencia de implicación de integrinas α4 y α3 en la infección epitelial por HiNT. Las células A549 fueron incubadas con concentraciones crecientes de los anticuerpos bloqueantes anti-integrina α4 P4C2 y anti-integrina α3 P1B5, e infectadas con HiNT375. Se cuantificó la tasa de adhesión bacteriana en cada caso, (d) y (e) respectivamente.

La actividad de tirosina quinasas de la familia Src está regulada positivamente por su fosforilación en el residuo Tyr418, localizado en la región catalítica de las

quinasas de esta familia. Este residuo tirosina es fosforilado en respuesta a determinados estímulos (Guarino, 2010). Se analizó si la infección de células A549 con HiNT estimula la fosforilación Tyr418 y subsiguiente activación de tirosina quinasas de la familia Src. Se depositaron 2.4×10^5 células A549 en placas de 60x15 mm y se incubaron hasta alcanzar una confluencia $\sim 9.6 \times 10^5$ células/placa. A continuación, las células fueron infectadas con HiNT375 durante 10, 20, 40, 60, 80, 100 y 120 min. Los niveles de fosforilación de Tyr418 en quinasas de la familia Src en respuesta a la infección bacteriana se monitorizó mediante *Western blot*, utilizando un anticuerpo primario conejo anti-Src^{Y418} y un anticuerpo secundario ratón anti-conejo-HRP. La infección de células A549 por HiNT375 aumentó el nivel de fosforilación de tirosina quinasas de la familia Src en Tyr418 (**Fig. 28d**).

Dado que las tirosina quinasas fosforilan un repertorio de proteínas eucariotas, se analizó si la activación de tirosina quinasas de la familia Src provoca un cambio en los niveles de fosforilación de proteínas citosólicas de células A549. Las células A549 se infectaron en las condiciones descritas para la detección de Tyr418 fosforilado (**Fig. 28d**) y se monitorizó el nivel de fosforilación de las proteínas citosólicas mediante *Western blot*, utilizando un anticuerpo primario ratón anti-P-tirosina (4G10) y un anticuerpo secundario conejo anti-ratón-HRP. La infección de células A549 por HiNT indujo un aumento en el nivel general de fosforilación de proteínas citosólicas (**Fig. 28e**).

Por último, las células A549 se transfectaron con un plásmido que expresa la fusión pSrc-GFP. 48 h después de la transfección, las células A549 se infectaron con HiNT durante 120 min y se fijaron con PFA. Las bacterias se tiñeron con un anticuerpo primario conejo anti-HiNT y un anticuerpo secundario burro anti-conejo-Texas Red (rojo) o con Hoescht 33342 (azul), para su visualización mediante microscopía de fluorescencia. Se observó que HiNT375 colocaliza con Src-GFP (verde) en células A549 (**Fig. 28f**).

El conjunto de estos datos mostró una contribución positiva de FAK y de tirosina quinasas de la familia Src, en particular c-Src, en la invasión de células A549 por HiNT375.

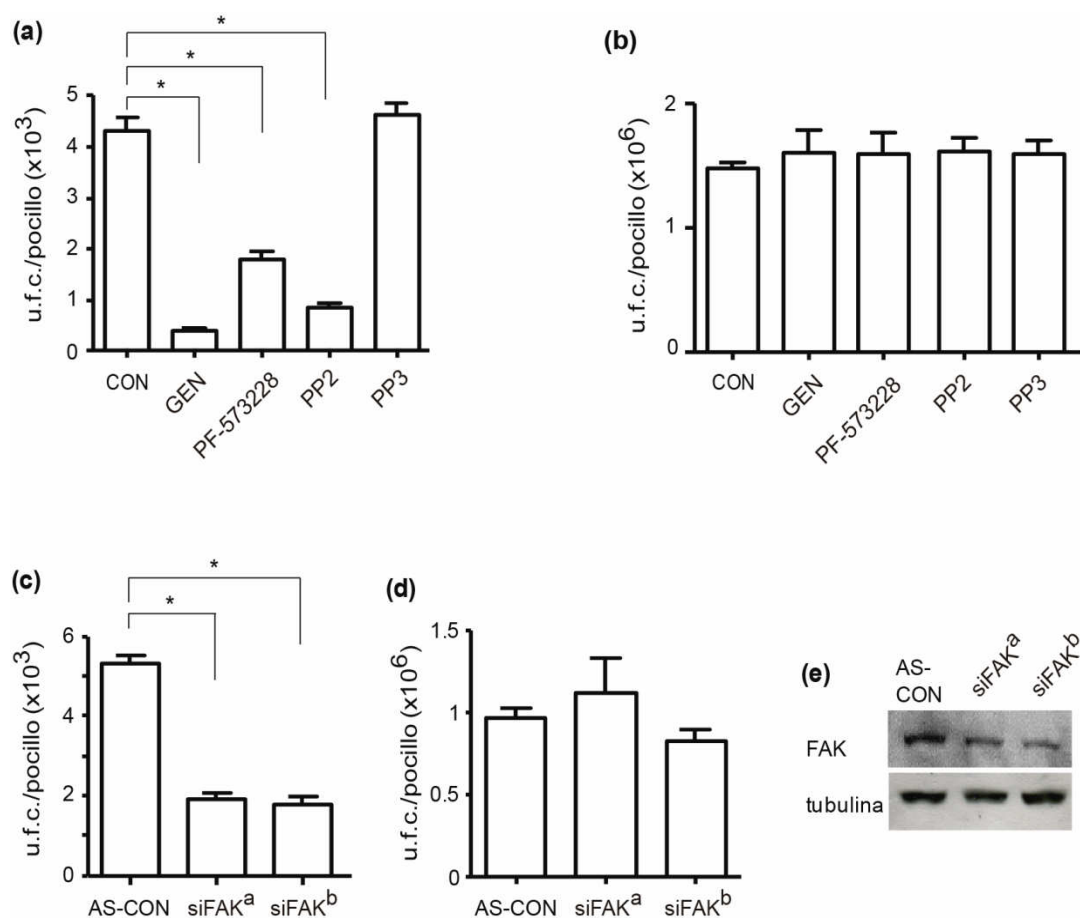


Figura 27. Las tirosina quinasas de la célula hospedadora están implicadas en la invasión de HiINT375. Las células A549 fueron pretratadas con genisteína, PP2, PF-573228 o PP3, e infectadas con HiINT375. Se cuantificaron la invasión (a) y adhesión (b) bacteriana, en presencia o ausencia (CON) de cada inhibidor farmacológico. La quinasa FAK está implicada en la invasión epitelial por HiINT375. FAK fue interferida en células A549 con dsARNi FAK^a y FAK^b; las células se infectaron con HiINT375 y se cuantificó la tasa de internalización (c) y de adhesión (d) bacteriana. (e) Monitorización de la interferencia de FAK mediante *Western blot* anti-FAK (panel superior). El control de carga se realizó mediante inmunodetección de tubulina (panel inferior).

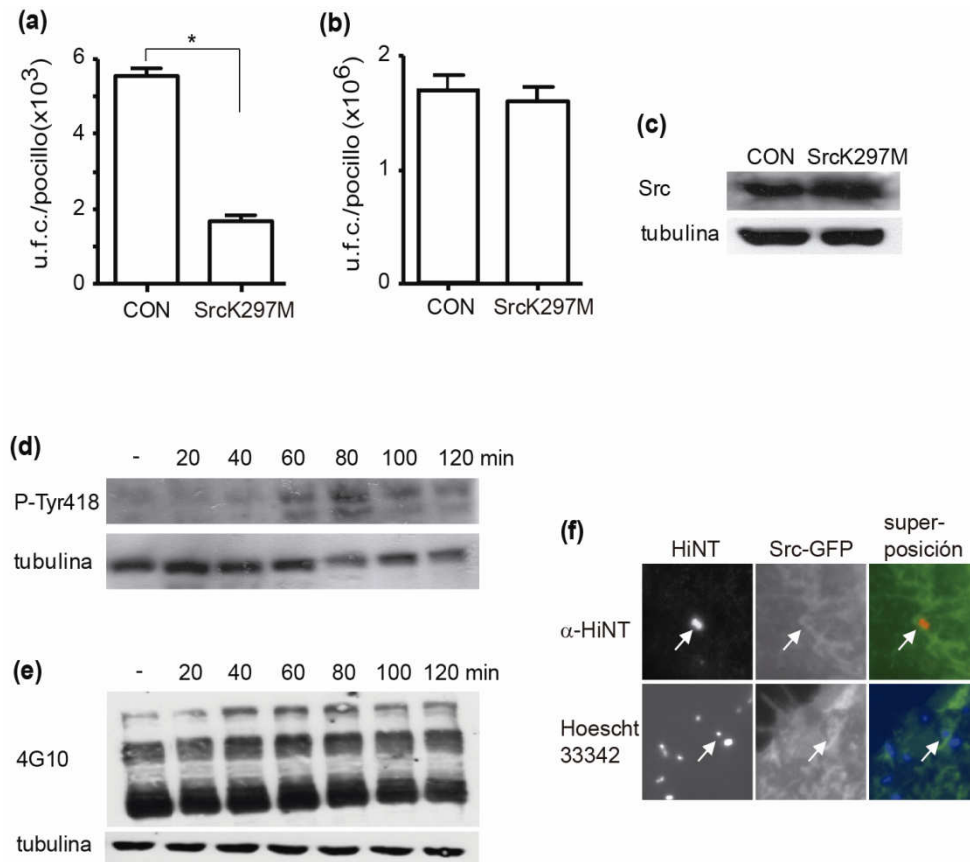


Figura 28. Las quinasas de la familia Src, incluyendo c-Src, están implicadas en la invasión epitelial por HiNT375. La variante inactiva de c-Src SrcK297M fue sobreexpresada en células A549 mediante transfección transitoria con pSrcK297M; las células se infectaron con HiNT375 y se cuantificó la invasión **(a)** y la adhesión **(b)** bacteriana. **(c)** Monitorización de la sobreexpresión de c-SrcK297M mediante *Western blot* anti-Src (panel superior). El control de carga se realizó mediante inmunodetección de tubulina (panel inferior). **(d)** Monitorización de la fosforilación de tirosina quinasas de la familia Src en la posición Y418 mediante *Western blot* anti-SrcPY⁴¹⁸ (panel superior). Los extractos celulares se prepararon con células no infectadas (-), o infectadas con HiNT375 durante 20, 40, 60, 80, 100 y 120 min. El control de carga se realizó mediante inmunodetección de tubulina (panel inferior). **(e)** Monitorización de la fosforilación en tirosina de proteínas celulares mediante *Western blot* anti-PTyr 4G10. Los extractos celulares se prepararon de la forma descrita en (d). **(f)** Co-localización de HiNT con Src. Las células A549 se transfectaron con pSrc-GFP. HiNT se tiñó con anticuerpos conejo anti-HiNT y burro anti-conejo conjugado con RXX (rojo) (panel superior), o con Hoescht 33342 (azul) (panel inferior). Src-GFP se observa en verde. La imagen es representativa de una infección de células A549 con HiNT375 durante 120 min.

2.1.6. Contribución de GTPasas de la familia Rho en la invasión epitelial por HiNT

La señalización celular mediada por integrinas puede estar asociada a GTPasas de la familia Rho. Cdc42, Rac y RhoA son miembros integrantes de esta familia (Caswell *et al.*, 2009; Huveneers & Danen, 2009). Algunos patógenos manipulan el citoesqueleto para invadir la célula hospedadora a través de la modulación de la actividad de las GTPasas de la familia Rho (Carabeo, 2011; Yoshida *et al.*, 2003). Se analizó el efecto de la exposición celular a toxina B de *Clostridium difficile*, que inhibe Cdc42, Rac y RhoA, en la invasión de células A549 por HiNT. Este inhibidor no modificó los niveles de adhesión y/o invasión de HiNT375 (**Fig. 29a**). A continuación, se analizó el papel de Rac1 mediante tratamiento de las células A549 con el inhibidor NSC23766 e infección con HiNT375. La exposición celular a este agente farmacológico disminuyó la tasa de invasión bacteriana (**Fig. 29a**), si bien la adhesión fue similar a la obtenida al infectar células control (**Fig. 30a**). Por el contrario, el tratamiento celular con CT04, un inhibidor específico de RhoA, incrementó el número de bacterias intracelulares (**Fig. 29a**). El tratamiento de las células con CT04 no modificó la adhesión bacteriana (**Fig. 30a**).

Para confirmar la implicación de Rac1 en la invasión epitelial por HiNT, las células A549 fueron transfectadas con un *pool* de cuatro dsARNi que reducen la expresión de Rac1, e infectadas con HiNT375 48 h después. La invasión de HiNT375 en células transfectadas con el *pool* de dsARNi fue menor a la observada en células control, transfectadas con dsARNi AllStars (AS-CON) (**Fig. 29b**). La adhesión bacteriana no cambió al interferir Rac1 (**Fig. 30b**). La eficacia de la interferencia de Rac1 se monitorizó mediante *Western blot*, utilizando un anticuerpo primario ratón anti-Rac1 y un anticuerpo secundario conejo anti-ratón-HRP (**Fig. 29c, panel superior**). Estos datos muestran que la GTPasa Rac1 está implicada en la invasión de células A549 por HiNT.

Vav2 es un GEF de Rac1 que se activa mediante fosforilación dependiente de Src (Marignani & Carpenter, 2001). En base a los resultados obtenidos (**Figs. 27a, 28a y 29a**), que sugieren que Src y Rac1 están implicados en la invasión del epitelio respiratorio por HiNT375, se analizó el papel de Vav2 en este proceso. Las células A549 se transfectaron

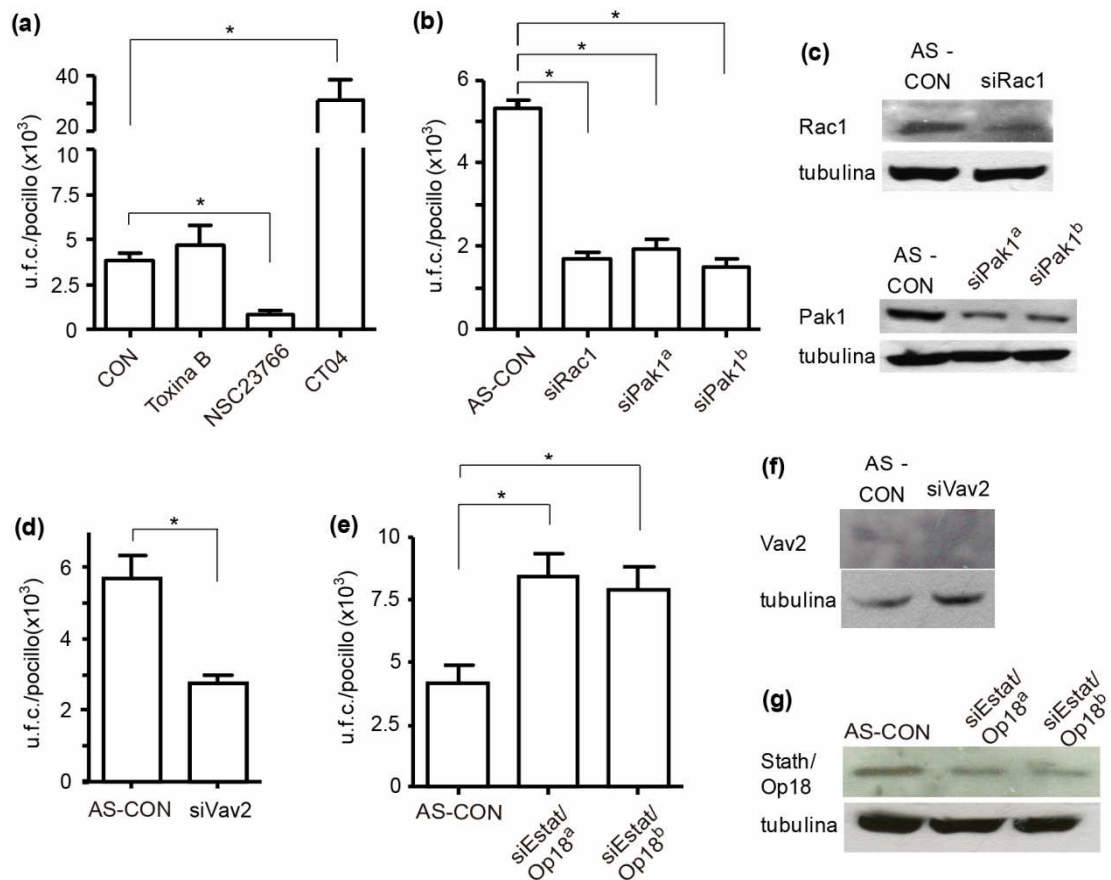


Figura 29. GTPasas de la familia Rho actúan de forma coordinada en la invasión epitelial por HiNT375. (a) Las células A549 fueron pretratadas con NSC23766, CT04, o toxina B de *C. botulinum*, e infectadas con HiNT375. Se cuantificó la invasión bacteriana, en presencia o ausencia (CON) de cada inhibidor farmacológico. (b) Rac1 y Pak1 fueron interferidos en células A549 con dsARNi Rac1, Pak1^a y Pak1^b; las células se infectaron con HiNT375 y se cuantificó la tasa de internalización bacteriana. (c) Monitorización de la interferencia de Rac1 y Pak1 mediante *Western blot* anti-Rac1 (panel superior) y anti-Pak1 (panel inferior). (d) Vav2 fue interferido en células A549 con dsARNi Vav2; las células se infectaron con HiNT375 y se cuantificó la tasa de internalización bacteriana. (e) Op18/estatmina fue interferido en células A549 con dsARNi Op18/estatmina; las células se infectaron con HiNT375 y se cuantificó la tasa de internalización bacteriana. (f) Monitorización de la interferencia de Vav2 mediante *Western blot* anti-Vav2 (panel superior). (g) Op18/estatmina fue interferido en células A549 con dsARNi Op18/estatmina; las células se infectaron con HiNT375 y se cuantificó la tasa de internalización bacteriana. (g) Monitorización de la interferencia de Op18/estatmina mediante *Western blot* anti-Op18/estatmina (panel superior). En todos los casos, los controles de carga se realizaron mediante inmunodetección de tubulina (paneles inferiores en c, f y g).

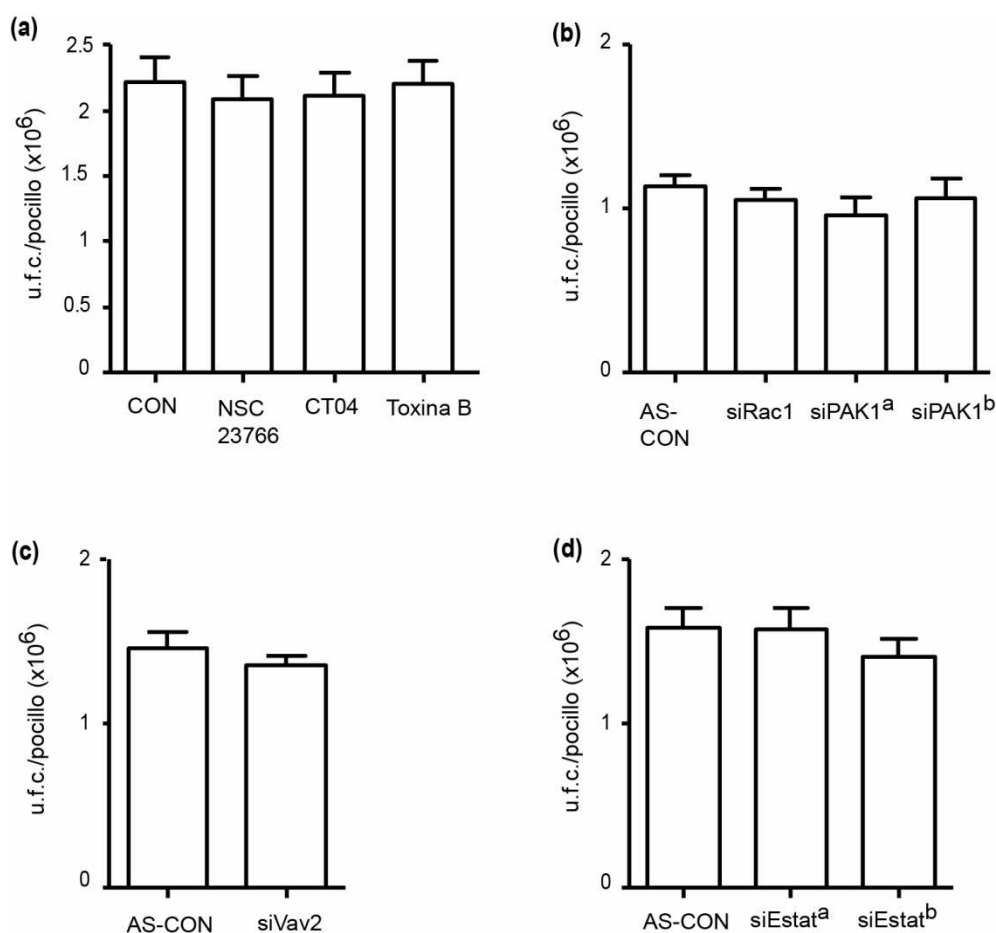


Figura. 30. GTPasas de la familia Rho no modulan la adhesión epitelial de HiNT375. (a) Las células A549 fueron pretratadas con NSC23766, CT04, o toxina B de *C. botulinum*, e infectadas con HiNT375. Se cuantificó la adhesión bacteriana, en presencia o ausencia (CON) de cada inhibidor farmacológico. (b) Rac1 y Pak1 fueron interferidos en células A549 con dsARNi Rac1, Pak1^a y Pak1^b; las células se infectaron con HiNT375 y se cuantificó la tasa de adhesión bacteriana. (c) Vav2 fue interferido en células A549 con dsARNi Vav2; las células se infectaron con HiNT375 y se cuantificó la adhesión bacteriana. (d) Op18/estatmina fue interferido en células A549 con dsARNi Op18/estatmina; las células se infectaron con HiNT375 y se cuantificó la adhesión bacteriana.

con un *pool* de dos dsARNi para interferir la expresión de Vav2. La tasa de invasión bacteriana en células transfectadas en las que se interfirió Vav-2 fue menor a la observada en células transfectadas con dsARNi control AllStars (**Fig. 29d**). La adhesión bacteriana no se vio alterada al interferir Vav2 (**Fig. 30c**). La eficacia de la interferencia de Vav2 se monitorizó mediante *Western blot*, utilizando un anticuerpo primario conejo anti-Vav2 y un anticuerpo secundario ratón-anticonejo-HRP (**Fig. 29f**).

Paks son una familia de serina-treonina quinasas que actúan como efectores de Rac1 (Van den Broeke *et al.*, 2010). Dado que los resultados obtenidos indican la implicación de Rac1 en la invasión del epitelio respiratorio por HiNT, se analizó el papel de Pak1 en este proceso. Las células se transfectaron de forma independiente con dos dsARNi que reducen la expresión de Pak1, Pak1^a y Pak1^b, y se infectaron con HiNT375 48 h después. La invasión de HiNT375 en células transfectadas con los dsARNi Pak1^a y Pak1^b fue menor que la observada en células control, transfectadas con dsARNi AllStars (AS-CON) (**Fig. 29b**). La adhesión bacteriana no se vio alterada al interferir Pak1 (**Fig. 30b**). La eficacia de la interferencia de Pak1 se monitorizó mediante *Western blot*, utilizando un anticuerpo primario conejo anti-Pak y un anticuerpo secundario ratón anti-conejo-HRP (**Fig. 29c, panel inferior**).

La polimerización del citoesqueleto de microtúbulos eucariota es un proceso dinámico que depende de Rac1. Rac1 promueve la polimerización y crecimiento de los microtúbulos en células en migración a través de Pak1, que inhibe la proteína Op18/estatmina. Op18/estatmina desestabiliza la integridad de los microtúbulos, por lo que el efecto inhibitorio de Pak1 sobre Op18/estatmina contribuye a la estabilización de dicho citoesqueleto (Raftopoulou & Hall, 2004). La importancia del citoesqueleto de microtúbulos en la invasión de HiNT375 fue establecida previamente en nuestro laboratorio mediante el uso de los inhibidores nocodazol y colchicina. La exposición celular a estos compuestos disminuyó la tasa de invasión de HiNT375 en células A549 (Morey *et al.*, 2011). Para analizar el papel de Op18/estatmina en la invasión epitelial por HiNT375, las células se transfectaron de forma independiente con dos dsARNi que reducen la expresión de Op18/estatmina, Op18/estatmina^a y Op18/estatmina^b, y se infectaron con HiNT375 48 h después. La invasión de HiNT375 en células transfectadas con los dsARNi Op18/estatmina^a y Op18/estatmina^b fue menor que la observada en células control transfectadas con un dsARNi AllStars (AS-CON) (**Fig. 29e**). La eficacia de la interferencia de Op18/estatmina se monitorizó mediante *Western blot*, utilizando un anticuerpo primario conejo anti-Op18/estatmina y un anticuerpo secundario ratón anti-conejo-HRP (**Fig. 29g**).

En conjunto, estos datos muestran que la invasión de células A549 por HiNT375 requiere la señalización Vav2-Rac1-Pak1-Op18/estatmina para modular de forma adecuada la dinámica de los microtúbulos de la célula hospedadora.

2.1.7. Los niveles de AMP cíclico eucariota modulan la invasión de HiNT en el epitelio respiratorio

Los mensajeros secundarios como el AMP cíclico (AMPc) modulan multitud de funciones celulares. El AMPc regula negativamente la actividad de Rac1, en un proceso dirigido por la proteína quinasa A (PKA) (Howe, 2004; Nagasawa *et al.*, 2005; O'Connor & Mercurio, 2001; Waschke *et al.*, 2004). Esta evidencia, y el requerimiento de Rac1 en la invasión de HiNT mostrado anteriormente (**Fig. 29a**), nos llevó a analizar el papel de AMPc y PKA en la invasión epitelial por HiNT375. Las células A549 se trataron con forskolin, un activador de adenilato ciclasas, mediadores de la conversión de ATP en AMPc (Song *et al.*, 2007). El tratamiento celular con forskolin redujo la invasión bacteriana, sugiriendo que el incremento en la [AMPc] intracelular puede bloquear la invasión de HiNT375 (**Fig. 31a**). De la misma forma, se analizó el efecto de la exposición celular a prostaglandina E2 (PGE₂) en la invasión de HiNT375. La actividad de PGE₂ está mediada por los 4 receptores prostanoideos EP1-EP4, presentes en células A549 (Fang *et al.*, 2004; Vancheri *et al.*, 2004). La activación de EP2 y EP4 incrementa la [AMPc] intracelular (Vancheri *et al.*, 2004). La adición de PGE₂ exógeno redujo la tasa invasión de HiNT375 en células A549, apoyando los datos obtenidos con forskolin (**Fig.31a**). El tratamiento de células A549 con forskolin o PGE₂ no modificó la adhesión bacteriana, respecto a la observada en células control (**Fig. 31b**).

Una vez establecido que el incremento de [AMPc] reduce la invasión de HiNT375, se analizó el papel de PKA en este proceso. En base a la observación que indica que PKA puede bloquear la activación de Rac1 (Howe, 2004; Nagasawa *et al.*, 2005; O'Connor & Mercurio, 2001; Waschke *et al.*, 2004), planteamos que la inhibición de PKA podría favorecer la internalización de HiNT375. Se empleó el inhibidor farmacológico de PKA H-89, lo que incrementó la tasa de invasión de HiNT375 en células A549, sin alterar la adhesión bacteriana (**Fig. 31a**).

Estos datos sugieren que el incremento de [AMPc] citosólico y la activación de PKA son dos eventos que contribuyen a prevenir la invasión de HiNT en el epitelio respiratorio.

2.8. La fosforilación de Akt en células A549 infectadas por HiNT depende de Src y Rac1

Estudios previos indican que Src puede jugar un papel en la activación de PI3K (Guarino, 2010). Habiendo determinado la implicación de Src en la invasión de células A549 por HiNT375, se analizó si la fosforilación de Akt depende de tirosina quinasas de la familia Src. Analizamos mediante *Western blot* el nivel de fosforilación de Akt en Ser473 en células A549 infectadas por HiNT375, en ausencia o presencia del inhibidor de Src PP2. Se empleó un anticuerpo primario conejo anti-P^{Ser473}Akt y un anticuerpo secundario cabra anti-conejo-HRP. El tratamiento celular con PP2 redujo el nivel de fosforilación de Akt inducido por la infección por HiNT375 (**Fig. 32a**).

Por otra parte, Rac1 regula la dinámica de los fosfolinosítidos durante la invasión bacteriana (Wong & Isberg, 2003). Habiendo establecido la importancia de Rac1 en la invasión de HiNT (**Fig. 29a**), se determinó si la fosforilación de Akt inducida por HiNT es dependiente de Rac1. Se analizó el nivel de fosforilación de Akt en Ser 473 en células A549 infectadas por HiNT375, en ausencia o presencia del inhibidor de Rac1 NSC27366. Se empleó un anticuerpo primario conejo anti-P^{Ser473}Akt y un anticuerpo secundario cabra anti-conejo-HRP. El nivel de fosforilación de Akt fue menor en células tratadas con NSC27366 que en células control no tratadas (**Fig. 32b**).

Estos datos muestran que la fosforilación de Akt en Ser473 en células A549 infectadas por HiNT es un evento de señalización que depende de tirosina quinasas de la familia Src y de la GTPasa Rac1.

2.1.9. Papel de RhoA en la invasión del epitelio respiratorio por HiNT375

Para confirmar la implicación de RhoA en la invasión epitelial por HiNT, las células A549 fueron transfectadas con un *pool* de cuatro dsARNi que reducen la expresión de RhoA, e infectadas con HiNT375 48 h después. La invasión de HiNT375 en células transfectadas con el *pool* de dsARNi fue menor que la observada en células control, transfectadas con dsARNi AllStars (AS-CON) (**Fig. 33a**). La adhesión bacteriana no se vio alterada al interferir RhoA (**Fig. 33b**). La eficacia de la interferencia de RhoA se monitorizó mediante *Western blot*, utilizando un anticuerpo ratón anti-RhoA y un anticuerpo secundario conejo anti-ratón-HRP (**Fig. 33c**).

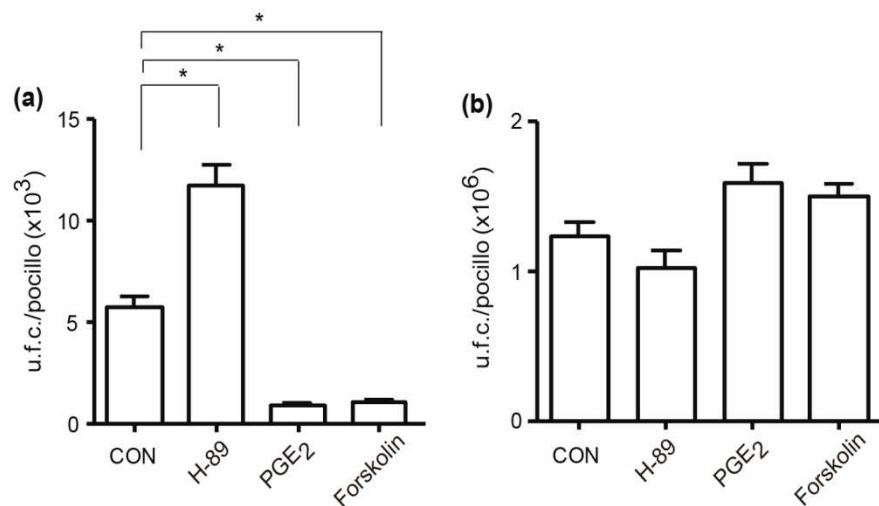


Figura 31. El incremento de [AMPC] citosólico reduce la invasión del epitelio respiratorio por HiNT375. Las células A549 fueron pretratadas con PGE₂ exógeno, forskolin o H-89, e infectadas con HiNT375. Se cuantificaron la invasión (a) y adhesión (b) bacteriana, en presencia o ausencia (CON) de cada inhibidor farmacológico.

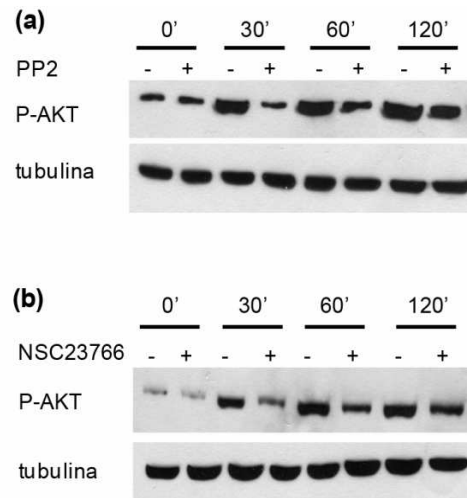


Figura 32. Las tirosina quinasas de la familia Src y Rac1 modulan la activación de Akt durante la infección por HiNT375. (a) Las tirosina quinasas de la familia Src modulan la activación de Akt en el curso de la infección por HiNT. Detección de la fosforilación de Akt en la posición Ser473 mediante Western blot con anti-AktPSer⁴⁷³. Los extractos celulares se prepararon con células no infectadas (-), o infectadas con HiNT durante 20, 40, 60, 80, 100 y 120 min en presencia (+) o ausencia (-) del inhibidor PP2 (panel superior). El control de carga se realizó mediante inmunodetección de tubulina (panel inferior). (b) Rac1 modula la activación de Akt durante la infección de HiNT. Detección de la fosforilación de Akt en la posición Ser473 mediante Western blot con anti-AktPSer⁴⁷³. Los extractos celulares se prepararon con células no infectadas (-), o infectadas con HiNT durante 20, 40, 60, 80, 100 y 120 min en presencia (+) o ausencia (-) del inhibidor NSC23766 (panel superior). El control de carga se realizó mediante inmunodetección de tubulina (panel inferior).

ROCK es una serina-treonina quinasa que actúa como efector de RhoA (Raftopoulou & Hall, 2004). Dado que los resultados obtenidos sugieren la implicación de RhoA en la invasión epitelial por HiNT (**Fig 33a**), se analizó el papel de ROCK en la invasión de HiNT375 en células A549. Se usó el inhibidor específico de ROCK Y-27632. La exposición celular a Y-27632 aumentó la tasa de invasión de HiNT375 (**Fig. 33d**). La adhesión bacteriana no se vio alterada (**Fig. 33e**). Por otro lado, existen evidencias que indican la existencia de una conexión entre RhoA-ROCK y el citoesqueleto de microtúbulos, y que ROCK reduce la estabilidad de los microtúbulos (Takesono *et al.*, 2010). La importancia del citoesqueleto de microtúbulos en la invasión de HiNT375 fue establecida previamente en nuestro laboratorio, mediante el uso de nocodazol y colchicina (Morey *et al.*, 2011). Para analizar si la inhibición del desestabilizante de microtúbulos ROCK restaura el efecto negativo del tratamiento celular con colchicina, favoreciendo así la invasión epitelial por HiNT375, las células A549 se pretrataron 1 h con colchicina, posteriormente 30 min con Y-27632 y a continuación se infectaron con HiNT375. El tratamiento con Y-27632 abolió el efecto negativo de la colchicina, restaurando la invasión bacteriana a los niveles obtenidos en células no tratadas (**Fig. 33d**).

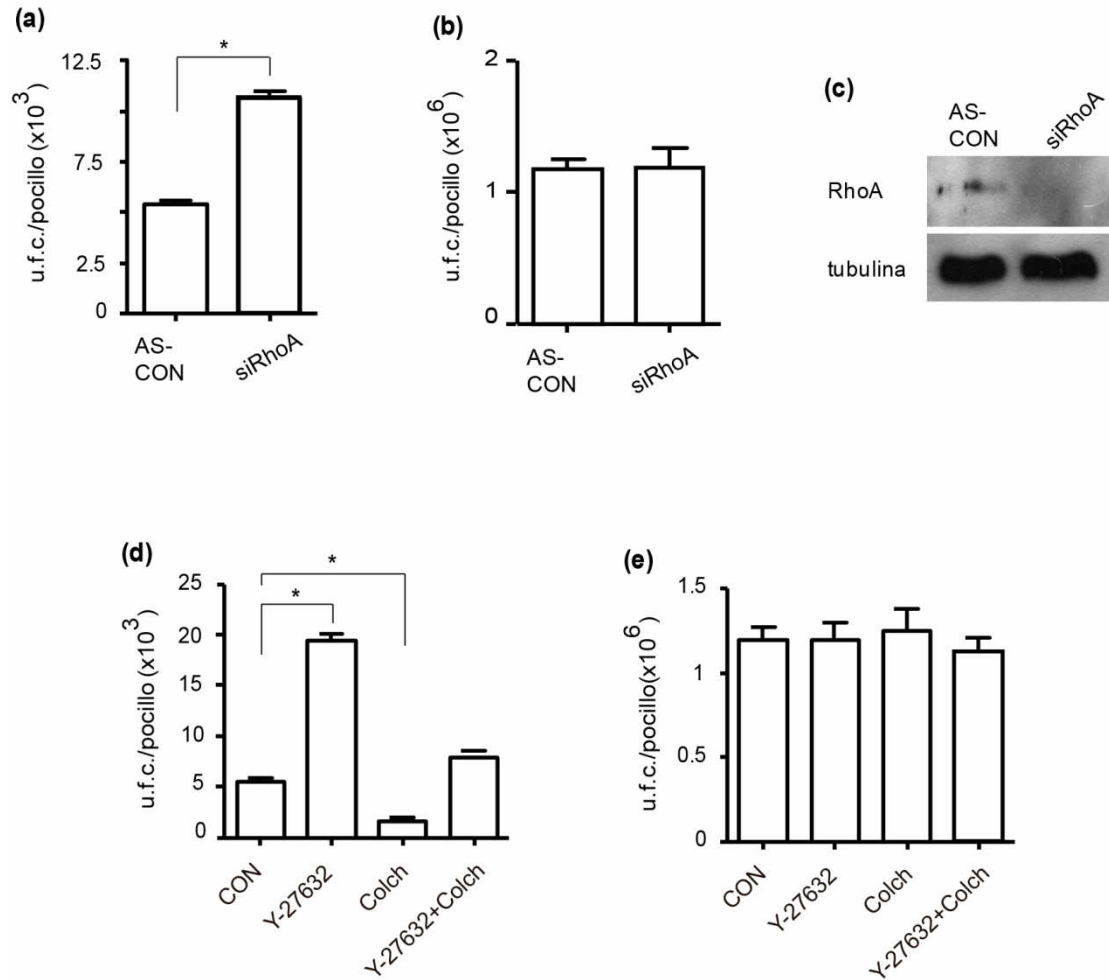


Figura 33. RhoA y ROCK previenen la internalización epitelial de HiNT375. RhoA fue interferido en células A549 con dsARNi RhoA; las células se infectaron con HiNT375 y se cuantificaron las tasas de internalización **(a)** y adhesión **(b)** bacteriana. **(c)** Monitorización de la interferencia de RhoA mediante *Western blot* anti-RhoA (panel superior). El control de carga se realizó mediante inmunodetección de tubulina (panel inferior). Papel de ROCK en la invasión epitelial por HiNT. Las células A549 fueron pretratadas con Y-27632, colchicina o Y-27632+colchicina, e infectadas con HiNT375. Se cuantificaron la invasión **(d)** y adhesión **(e)** bacteriana, en presencia o ausencia (CON) de cada inhibidor farmacológico.

2.2. Análisis de la contribución relativa de las adhesinas PCho, P5 y Hap y a la infección por HiNT

2.2.1. Análisis de variabilidad entre aislados clínicos en la dinámica de la interacción entre HiNT y el epitelio pulmonar humano

Mediante una colaboración establecida con los Drs. J. Liñares (H. Bellvitge) y A. Oliver (Hospital Universitario Son Espases, Mallorca), hemos dispuesto en nuestro laboratorio de una colección de 111 cepas clínicas de HiNT no isogénicas, aisladas de 111 pacientes que sufrieron una infección aguda (1 cepa por paciente) (**Tabla 8, ANEXO I**). Trabajo previo realizado con un grupo de aislados de esta colección mostró heterogeneidad en sus niveles de adhesión al epitelio respiratorio humano en cultivo (Figura 3, Marti-Lliteras *et al.*, 2011). La adhesión variable observada nos llevó a preguntar la(s) razón(es) de la misma. Hipotetizamos que esta variabilidad fenotípica puede deberse, entre otros, a la heterogeneidad genética entre aislados, a diferencias entre cepas en la expresión de genes claves en la interacción epitelial, y/o a diferencias en los mecanismos de subversión de la maquinaria eucariota empleados por los distintos aislados.

Para explorar la variabilidad observada, seleccionamos tres cepas de referencia, (i) HiNT375, empleada en los análisis de mecanismos moleculares de invasión epitelial presentados en el apartado 2.1. de la sección de Resultados; (ii) HiNT398, aislado de un paciente EPOC usado en trabajos previos de nuestro laboratorio (Regueiro *et al.*, 2009); (iii) Hi Rd KW20, cepa cuyo genoma completo ha sido secuenciado (<http://cmr.jcvi.org/tigrscripts/CMR/GenomePage.cgi?database=ghi>), y seis aislados clínicos cuya adhesión epitelial ha sido caracterizada previamente (**Tabla 15**). El análisis de distribución génica de *lic1ABCD*, *ompP5* y *hap* mediante PCR con cebadores específicos empleando como molde ADN genómico de cada una de las cepas, determinó la presencia de las tres agrupaciones génicas en las nueve cepas seleccionadas. Igualmente, todas las cepas expresaron PCho en su superficie (**Tabla 16**). Estos datos sugieren que la variabilidad adhesiva entre aislados no está directamente asociada con una heterogeneidad en la distribución de los genes que codifican las adhesinas PCho, P5 y Hap.

A continuación, hemos realizado un análisis comparativo de la implicación de dos estructuras superficiales eucariotas, integrina $\alpha 5$ y glicosilación, en la adhesión epitelial de los aislados seleccionados.

Tabla 15. Origen clínico de los aislados de HiNT usados en este estudio.

Cepa	Características relevantes	Referencia
HiNT398	Aislado clínico de EPOC que expresa un nivel alto de PCho en la molécula de LOS. Nombre alternativo: cepa 157952	Regueiro <i>et al.</i> , 2009
HiNT1500	Cepa clínica aislada de un paciente EPOC; edad: 62 años	Pau Martí <i>et al.</i> , 2011
HiNT1560	Cepa clínica aislada de un paciente con enfisema; edad: 61 años	Pau Martí <i>et al.</i> , 2011
HiNT1566	Cepa clínica aislado de un paciente EPOC; edad: 74 años	Pau Martí <i>et al.</i> , 2011
HiNT1606	Cepa clínica aislada de un paciente con bronquiectasis; edad: 51 años	Pau Martí <i>et al.</i> , 2011
HiNT1619	Cepa clínica aislada de un paciente con fibrosis quística; edad: 3 años	Pau Martí <i>et al.</i> , 2011
HiNT1622	Cepa clínica aislada de un paciente con bronquiolitis; edad: 2 meses	Pau Martí <i>et al.</i> , 2011

Tabla 16. Distribución génica (*lic1ABCD*, *ompP5*, *hap* y *hmw*) y expresión de PCho en las cepas seleccionadas en este trabajo.

Cepa	<i>lic1ABCD</i>	PCho	<i>ompP5</i>	<i>hap</i>	<i>hmw1/2</i>
HiNT375	+	Alta	+	+	+
HiNT398	+	Alta	+	+	+
Hi Rd KW20	+	Baja	+	+	-
HiNT 86-028NP	+	Alta	+	+	+
HiNT1500	+	Alta	+	+	+
HiNT1560	+	Alta	+	+	+
HiNT1566	+	Doble	+	+	+
HiNT1606	+	Baja	+	+	+
HiNT1619	+	Alta	+	+	+
HiNT1622	+	Alta	+	+	+

Para analizar la implicación de la integrina $\alpha 5$ en la adhesión epitelial de las cepas en estudio, las células A549 se incubaron con el anticuerpo bloqueante anti-integrina $\alpha 5$ PID6 y se infectaron independientemente con cada cepa. La incubación celular con PID6 provocó una disminución de los niveles de adhesión de todas las cepas respecto a células control no tratadas, excepto en el caso de Hi Rd KW20. Igualmente, las células fueron incubadas con un péptido sintético que contiene la secuencia RGD, lo que provocó una disminución de los niveles de adhesión de todas las cepas, excepto Hi Rd KW20, respecto a las células control no tratadas (**Fig. 34**).

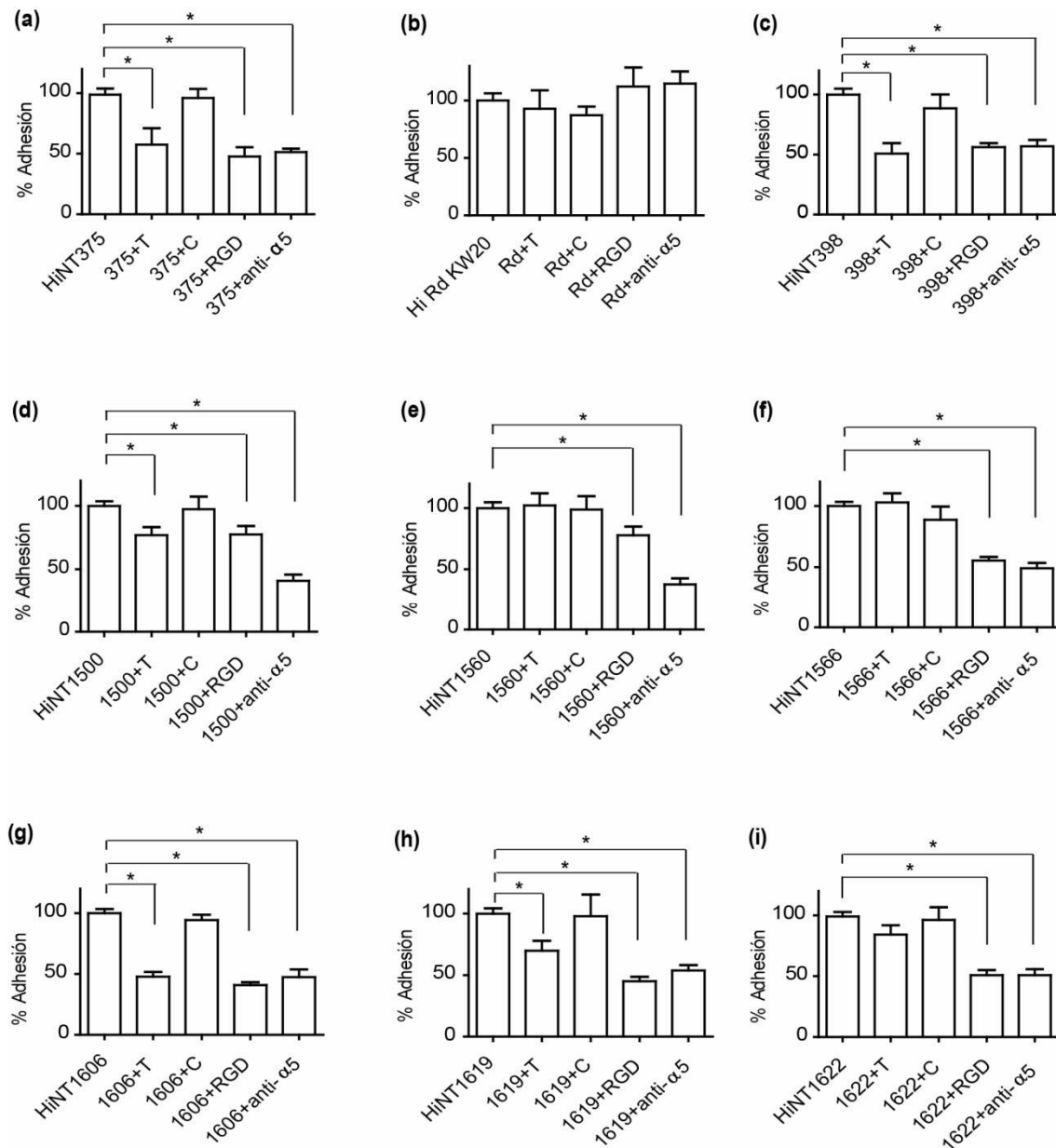


Figura 34. Papel de la integrina $\alpha 5$ y de glicosilaciones eucariotas en la adhesión epitelial de aislados clínicos de HiNT. Se usaron las cepas HiNT375 (a), Hi Rd KW20 (b), HiNT398 (c), HiNT1500 (d), HiNT1560 (e), HiNT1566 (f), HiNT1606 (g), HiNT1619 (h), HiNT1622 (i). Las células A549 se incubaron con tunicamicina (T), concanavalina A (C), el péptido sintético RGD, o el anticuerpo anti-integrina $\alpha 5$ PDI6, y se infectaron de forma independiente con cada una de las cepas. Se cuantificaron los niveles de adhesión bacteriana, comparados con la adhesión a células control no tratadas (primera columna de cada panel). Los datos están mostrados como porcentaje de adhesión, comparado con la adhesión de cada cepa a células control sin tratar (100%).

Estos resultados nos permiten extender a un número significativo de cepas el papel de la integrina $\alpha 5$ como un posible receptor celular de HiNT. Asimismo, los datos apuntan a la ausencia del putativo ligando bacteriano de integrina $\alpha 5$ en la cepa Hi Rd KW20.

Por otra parte, numerosas proteínas localizadas en la membrana plasmática de células eucariotas están glicosiladas (Taganna *et al.*, 2011). En este trabajo, analizamos la implicación de la N-glicosilación de proteínas (unión de carbohidratos al grupo amino de la cadena lateral de asparagina o glutamina) en la adhesión epitelial de HiNT. Las células A549 fueron tratadas con el inhibidor químico de N-glicosilación tunicamicina, e infectadas con las cepas seleccionadas. La tunicamicina provocó un descenso en la tasa de adhesión de HiNT375, HiNT398, HiNT1500, HiNT1606, HiNT1619 y HiNT1622, respecto a la observada en células control no tratadas. En cambio, Hi Rd KW20, HiNT1560 y HiNT1566 mostraron niveles de adhesión similares en células tratadas y en células control no tratadas (**Fig. 34**).

Por otra parte, la manosa es un monosacárido presente en algunas glucoproteínas animales y existen evidencias sobre la existencia de lectinas bacterianas que unen epitopos eucariotas con residuos manosilados, como la superlectina BC2L-C de *Burkholderia cenocepacia* (Sulak *et al.*, 2011). Para analizar el posible papel de residuos eucariotas manosilados en la infección epitelial por HiNT, las células A549 se incubaron con concanavalina A, una lectina que une de forma específica residuos de manosa, con el objeto de bloquear una posible unión de HiNT a residuos manosilados de la superficie epitelial. La incubación de células A549 con concanavalina A no alteró la tasa de adhesión de ninguna de las cepas analizadas, respecto a células control sin tratar (**Fig. 34**). Estos datos sugieren que HiNT no se adhiere a residuos de manosa en la superficie de la célula hospedadora.

En conjunto, los datos obtenidos con las 9 cepas analizadas sugieren que la variabilidad adhesiva entre aislados no está relacionada con una distribución heterogénea de *lic1ABCD*, *ompP5* y *hap*. Sin embargo, los datos obtenidos indican la existencia de variabilidad mecánica, al menos en relación con la subversión de residuos glicosilados de la superficie epitelial.

2.2.2. Análisis de la contribución de las adhesinas PCho, P5 y Hap de HiNT a fenotipos asociados a patogénesis mediante la caracterización de cepas mutantes

El análisis fenotípico en aislados clínicos resultó informativo, si bien no permitió el establecimiento de asociaciones claras entre adhesinas y los fenotipos analizados.

Para profundizar en este aspecto, se empleó la cepa HiNT375 y un conjunto de mutantes isogénicos que carecen de PCho, P5 y Hap, tres moléculas cuyo papel en la adhesión epitelial de HiNT ha sido descrito previamente (Hendrixson & St Geme, 1998; Swords *et al.*, 2000; Virji *et al.*, 2000). Las cepas empleadas son: HiNT375 Δ lic1BC, HiNT375 Δ ompP5, HiNT375 Δ hap, HiNT375 Δ hap Δ ompP5 y HiNT375 Δ hap Δ lic1BC. Las características completas de las cepas mutantes empleadas se presentan en la **Tabla 1 (Anexo I)**.

Se analizaron tres fenotipos asociados a la virulencia de HiNT, la agregación interbacteriana, la infección epitelial y mecanismos moleculares subyacentes, y la infección pulmonar en un modelo animal murino.

2.2.2.1. Contribución relativa de adhesinas de HiNT en estadíos iniciales de la infección

En primer lugar, se analizó la implicación de las adhesinas PCho, P5 y Hap en la capacidad de agregación inter-bacteriana de HiNT. Empleamos como controles negativos de agregación las cepas *E. coli* CC118 y Hi Rd KW20, y tomamos como punto de referencia el nivel de agregación de HiNT375, cepa en la que la agregación se hace evidente 2 h después del inicio del ensayo (**Tabla 17**). HiNT375 Δ hap mostró una capacidad de agregación menor que la cepa silvestre. Este resultado está de acuerdo con estudios previos que indican el papel de Hap en la formación de agregados de HiNT (Hendrixson & St Geme, 1998). HiNT375 Δ ompP5 y HiNT375 Δ lic1BC agregaron de forma comparable a la cepa silvestre, si bien se observó un descenso de DO_{600nm} a t=1 h ligeramente superior al de HiNT375. HiNT375 Δ hap Δ ompP5 y HiNT375 Δ hap Δ lic1BC agregaron de forma comparable a HiNT375 Δ hap, ligeramente más rápido en el caso de HiNT375 Δ hap Δ ompP5. Estos resultados confirman el papel de Hap en la agregación inter-bacteria y limitan la implicación de P5 y PCho en este fenotipo bacteriano.

A continuación, se analizó la contribución de las adhesinas PCho, P5 y Hap a la infección del epitelio pulmonar. Se analizaron las tasas de adhesión e invasión de HiNT375 Δ lic1BC, HiNT375 Δ ompP5, HiNT375 Δ hap, HiNT375 Δ hap Δ ompP5 y HiNT375 Δ hap Δ lic1BC, comparadas con la cepa silvestre. HiNT375 Δ ompP5 mostró niveles de adhesión e invasión menores que la cepa silvestre. HiNT375 Δ lic1BC mostró una tasa de adhesión mayor que la cepa silvestre. La adhesión e invasión de HiNT375 Δ hap, HiNT375 Δ hap Δ ompP5 y HiNT375 Δ hap Δ lic1BC fue comparable a los datos obtenidos con la cepa silvestre (**Fig. 35**).

Tabla 17. Análisis comparativo de la agregación de las cepas HiNT375, HiNT375 Δ lic1BC, HiNT375 Δ ompP5, HiNT375 Δ hap, HiNT375 Δ hap Δ ompP5 y HiNT375 Δ hap Δ lic1BC.

Cepa	0 h	1 h	2 h	3 h	4 h	5 h	6 h	7 h
<i>E. coli</i> CC118	1.03	1.03	1.03	1.04	1.03	1.04	1.04	1.03
Hi Rd KW20	1.00±0.04	0.96±0.05	0.93±0.03	0.86±0.06	0.80±0.08	0.75±0.10	0.72±0.12	0.67±0.12
HiNT375	1.04±0.04	0.94±0.03	0.46±0.03	0.36±0.04	0.28±0.03	0.24±0.04	0.20±0.04	0.18±0.05
HiNT Δ hap	1.03±0.02	0.95±0.03	0.84±0.06	0.69±0.10	0.56±0.06	0.47±0.04	0.36±0.06	0.27±0.05
HiNT Δ ompP5	0.97±0.08	0.62±0.22	0.32±0.17	0.23±0.10	0.20±0.09	0.14±0.08	0.13±0.07	0.10±0.05
HiNT Δ lic1BC	0.99±0.06	0.65±0.12	0.33±0.19	0.21±0.11	0.18±0.10	0.14±0.08	0.13±0.08	0.10±0.06
HiNT Δ hap Δ ompP5	1.00±0.01	0.89±0.11	0.70±0.08	0.49±0.13	0.38±0.08	0.32±0.07	0.27±0.05	0.21±0.04
HiNT Δ hap Δ lic1BC	1.00±0.01	0.94±0.04	0.84±0.01	0.75±0.04	0.60±0.05	0.52±0.03	0.40±0.01	0.32±0.01

Por último, se realizó un análisis comparativo de la implicación de la integrina $\alpha 5$ y la glicosilación de proteínas eucariotas en la adhesión epitelial de HiNT375 Δ lic1BC, HiNT375 Δ ompP5, HiNT375 Δ hap, HiNT375 Δ hap Δ ompP5 y HiNT375 Δ hap Δ lic1BC, comparadas con la cepa silvestre. Para analizar la implicación de la integrina $\alpha 5$ en la adhesión epitelial de las cepas mutantes en estudio, las células A549 se incubaron con el anticuerpo bloqueante anti-integrina $\alpha 5$ PID6 y se infectaron con cada cepa. La incubación de celular con PID6 provocó una disminución de la adhesión de todas las cepas mutantes respecto a células control no tratadas, igual que ocurre en el caso de la cepa silvestre (**Fig. 36**). Igualmente, las células fueron incubadas con un péptido sintético que contiene la secuencia RGD. La incubación de celular con RGD provocó una disminución de los niveles de adhesión de todas las cepas testadas, silvestre y mutantes, respecto a células control. Estos resultados excluyen la implicación de PCho, P5 y Hap y como ligandos de integrina $\alpha 5$ (**Fig. 36**).

Por otra parte, las células A549 fueron tratadas con tunicamicina e infectadas con el repertorio de estirpes mutantes. La tunicamicina provocó un descenso similar en la tasa de adhesión de todas las cepas testadas, HiNT375 y mutantes carentes de PCho, P5 y Hap. Este resultado excluye la implicación de las tres adhesinas mencionadas como ligando de proteínas N-glicosiladas (**Fig. 36**).

Por el contrario, la incubación de células A549 con concanavalina A no alteró la tasa de adhesión de las cepas, respecto a las células control, confirmando que la manosa no parece ser un ligando eucariota de posibles lectinas de HiNT (**Fig. 36**).

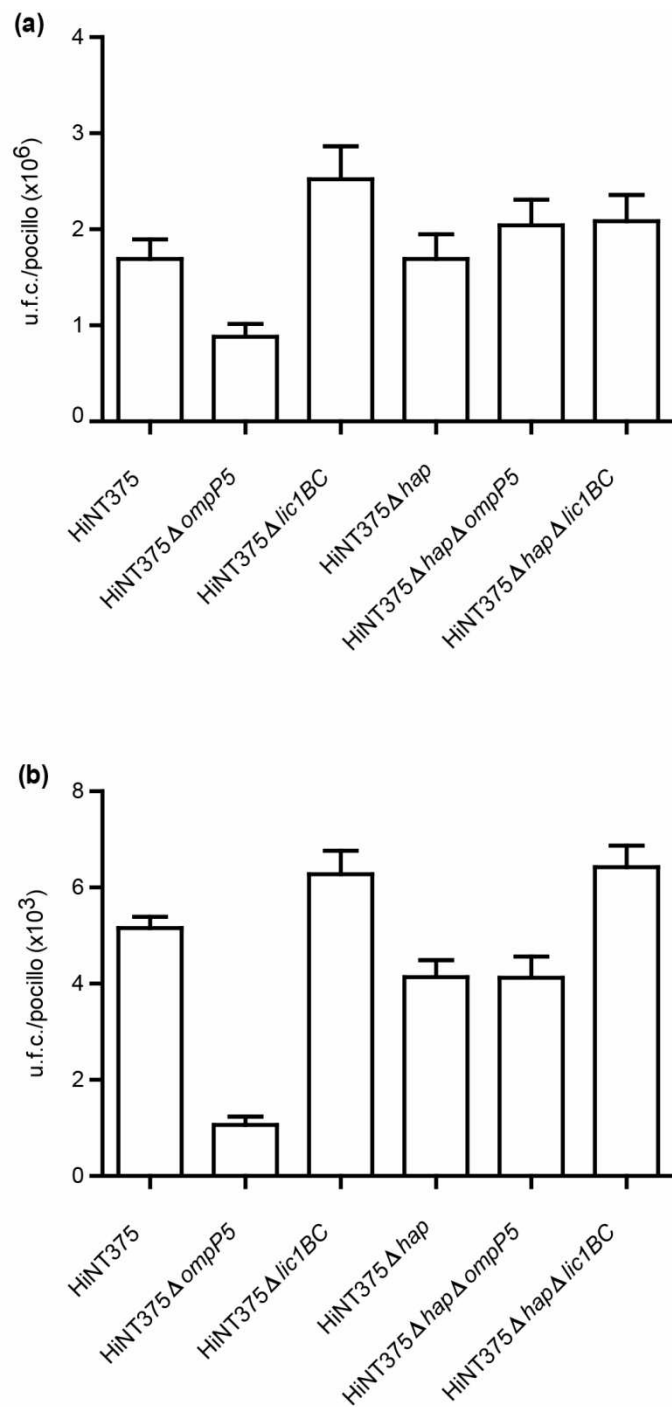


Figura 35. Análisis comparativo de la adhesión (a) e invasión (b) de *HiNT375*, *HiNT375Δlic1BC*, *HiNT375ΔompP5*, *HiNT375Δhap*, *HiNT375ΔhapΔompP5* y *HiNT375ΔhapΔlic1BC* a células A549.

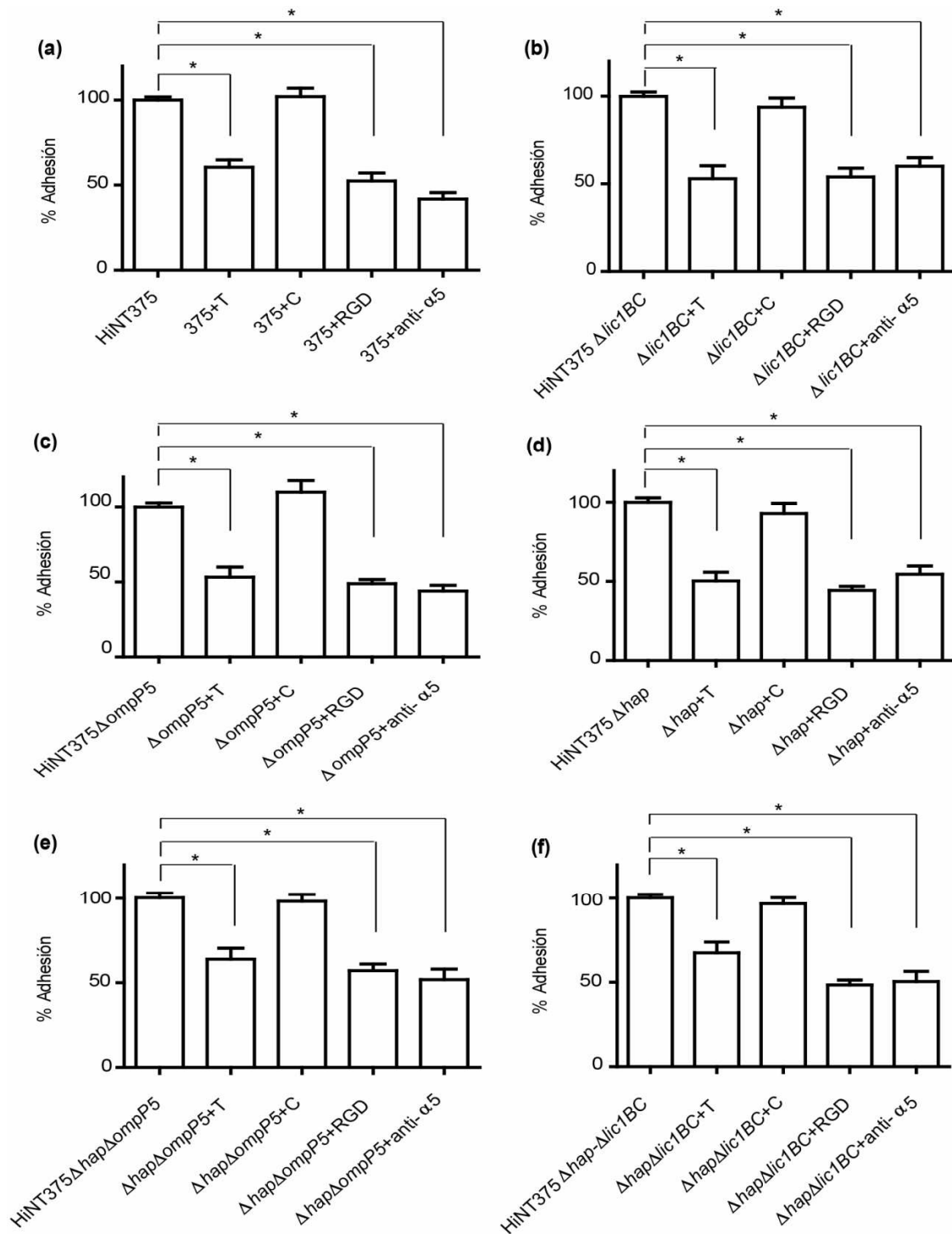


Figura 36. Papel de la integrina $\alpha 5$ y de glicosilaciones eucariotas en la adhesión epitelial de *HiNT375* (a), *HiNT375 $\Delta lic1BC$* (b), *HiNT375 $\Delta ompP5$* (c), *HiNT375 Δhap* (d), *HiNT375 $\Delta hap \Delta ompP5$* (e), *HiNT375 $\Delta hap \Delta lic1BC$* (f). Las células se incubaron con Tunicamicina (T), con Concanavalina A (C), con el péptido sintético RGD, o con anticuerpo anti-integrina $\alpha 5$ PDI6 y se infectaron de forma independiente con cada cepa. Se cuantificaron los niveles de adhesión bacteriana, comparados con la adhesión a células control no tratadas (primera columna de cada panel). Los datos están mostrados como porcentaje de adhesión comparados con la adhesión de cada cepa a las células control sin tratar.

2.2.2.2. Contribución relativa de adhesinas de HiNT en la infección *in vivo* mediante el empleo de un modelo de infección intranasal murina

Para analizar la implicación de las adhesinas PCho, P5 y Hap en la infección por HiNT *in vivo*, infectamos ratones CD1 intranasalmente con cantidades comparables de las cepas HiNT375, HiNT375 Δ lic1BC, HiNT375 Δ ompP5, HiNT375 Δ hap, HiNT375 Δ hap Δ ompP5 y HiNT375 Δ hap Δ lic1BC. Los animales se sacrificaron 24 y 48 h postinfección. Se realizó la disección y procesamiento de los pulmones, que fueron homogeneizados y plaqueados en sBHI-Agar para el recuento de u.f.c. Tras 24 h de infección, no se apreciaron diferencias significativas en los números de bacterias recuperadas de los pulmones de las cepas silvestre y mutantes (**Fig. 37a**). En cambio, tras 48 h de infección, los recuentos de HiNT375 Δ lic1BC, HiNT375 Δ ompP5 y HiNT375 Δ hap Δ ompP5 fueron menores a los obtenidos a partir de animales infectados con la cepa silvestre (**Fig. 37b**). Las cepas HiNT375 Δ hap y HiNT375 Δ hap Δ lic1BC mostraron recuentos similares a los de la cepa silvestre. Evidencias previas han sugerido la implicación de PCho en la infección pulmonar (Pang *et al.*, 2008). Nuestros resultados, además de confirmar esta evidencia, sugieren que P5 es importante en la infección pulmonar por HiNT. Asimismo, Hap no parece contribuir positivamente a la infección pulmonar por HiNT, ya que los recuentos bacterianos obtenidos a partir de ratones infectados con HiNT375 Δ hap Δ ompP5 y HiNT375 Δ hap Δ lic1BC resultaron mayores a los obtenidos a partir de ratones infectados con HiNT375 Δ ompP5 y HiNT375 Δ lic1BC, respectivamente (**Fig. 37b**). Por otro lado, las tráqueas de los animales sacrificados a las 48 h post-infección fueron diseccionadas, fijadas, embebidas en parafina y procesadas para inmunohistoquímica. HiNT se tiñó mediante un anticuerpo primario conejo anti-HiNT y un anticuerpo secundario anti-conejo conjugado a HRP. Las **Figuras 37c, d y e** son tres imágenes correspondientes a una diferente magnificación de la misma zona. En ellas vemos una sección de la tráquea de ratón, mostrando la presencia de HiNT en el interior de células con morfología de macrófago. Las imágenes son cortesía de la Dra. María Jesús Grilló, I. Agrobiotecnología-UPNA-CSIC.

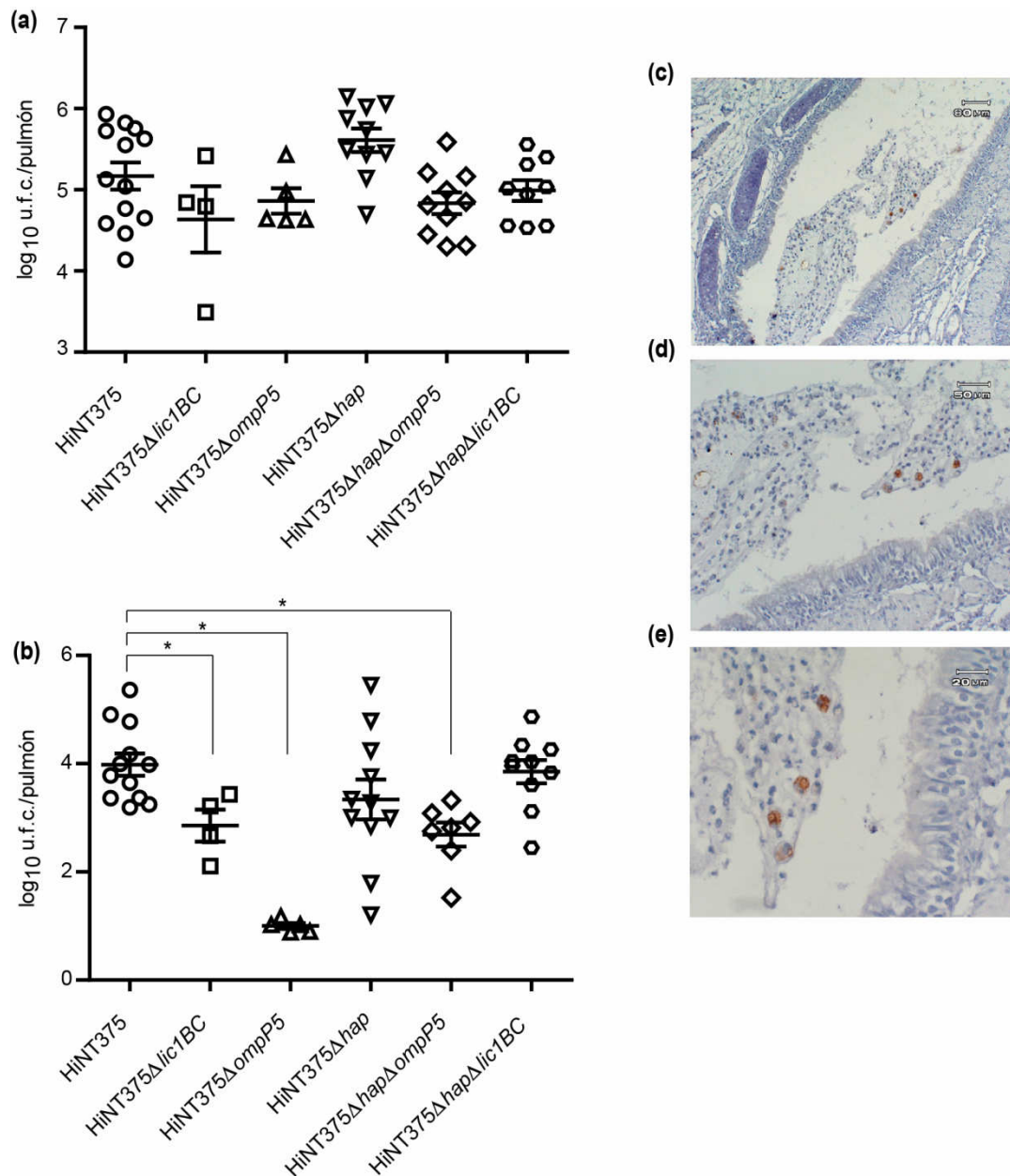


Figura 37. Análisis comparativo de la infección por HiNT375, HiNT375Δ*lic1BC*, HiNT375Δ*ompP5*, HiNT375Δ*hap*, HiNT375Δ*hap*Δ*ompP5* y HiNT375Δ*hap*Δ*lic1BC* mediante un modelo de infección intranasal murino. 10 ratones hembra CD1 de 4 semanas de edad y 20-22 g fueron infectados con cada cepa. Tras 24 h, se sacrificaron 5 ratones (a); tras 48 h, se sacrificaron los 5 ratones restantes (b). En ambos casos, los pulmones fueron diseccionados, homogeneizados y plaqueados en sBHI-Agar para el recuento de u.f.c./órgano. (c,d y e) Localización de HiNT en el interior de fagocitos profesionales *in vivo*. Serie de imágenes de inmunohistoquímica de una sección de tráquea de ratón, mostrando la presencia de HiNT en el interior de células con morfología de macrófago. Los animales fueron infectados intranasalmente con HiNT375 y sacrificados 48 h post-infección. Las tráqueas fueron diseccionadas, fijadas, embebidas en parafina y procesadas para inmunohistoquímica. Tinción: anticuerpo primario conejo anti-HiNT y anticuerpo secundario anti-conejo conjugado a HRP. La señal marrón en el interior de células con morfología de macrófago es indicativa de la presencia de bacterias intracelulares. Se muestran tres imágenes correspondientes a una diferente magnificación de la misma zona. Cortesía de Dra. María Jesús Grilló, I. Agrobiotecnología-UPNA-CSIC.

DISCUSIÓN

1. RESPUESTAS DEL HOSPEDADOR A LA INFECCIÓN POR AISLADOS RESPIRATORIOS CRÓNICOS DE HiNT Y POR MUTANTES TRUNCADOS EN EL LIPOOLIGOSACÁRIDO

En este trabajo, se ha analizado la heterogeneidad de un conjunto de cepas de HiNT aisladas de pacientes respiratorios crónicos en relación a tres fenotipos asociados a la virulencia de este patógeno bacteriano: resistencia a péptidos antimicrobianos, formación de biopelículas y adhesión a epitelio pulmonar humano. Un análisis de distribución de genes que codifican modificaciones del LOS en estos aislados indica que todos presentan los genes *lgtF*, *lpsA*, *lic2A*, *lic1ABCD*, *siaB*, *lic3A* y *lic3B*. Por el contrario, la distribución de *lic2C* es heterogénea, lo que determina variabilidad entre aislados en relación a la sustitución glucídica presente en la HepII del LOS (Pau Martí Lliteras, datos no publicados). Los aislados en estudio se agruparon en cepas de “nueva entrada” (sets de cepas del grupo A de pacientes, pacientes 1,10,13 y 16) y cepas crónicas (sets de cepas del grupo B de pacientes, pacientes 17,18 y 19). Los dos tipos de cepas (“nueva entrada” y crónicas) mostraron diferencias fundamentales en los tres ensayos realizados que discutimos a continuación. Los aislados clínicos de los pacientes 17, 18 y 19 (cepas crónicas en cada paciente) mostraron un incremento progresivo en la resistencia a los PAs PxB y β -defensina 1, es decir, en estos pacientes, la cepa aislada en cada visita fue más resistente a PAs que la aislada en la visita anterior, si bien mostraron el mismo pulsotipo. Dado que observamos la presencia de PCho en todos los aislados, que además presentaron la misma estructura de lípido A hexa-acilado, no se pudo establecer una asociación clara entre PCho o lípido A y la resistencia a PAs creciente observada. Tampoco se pudo establecer una asociación clara entre *lic2C* y la resistencia a PAs, dado que *lic2C* está variablemente presente entre las cepas analizadas. La resistencia de HiNT a PAs está asociada con el operón *sapABCDZF* (Mason *et al.*, 2005; Shelton *et al.*, 2011). La variación potencial de este operón entre los aislados analizados, en cuanto a distribución, conservación de secuencia o expresión, es desconocida.

Nuestros datos también sugieren que hay diferencias de adhesión entre los aislados clínicos analizados. Las cepas que forman parte de sets con el mismo perfil de PFGE (pacientes grupo B) mostraron una adhesión a células A549 menor que las cepas que forman parte de sets con distinto perfil de PFGE (pacientes grupo A). Este resultado es sorprendente, ya que resulta intuitivo establecer una asociación entre cronicidad, adaptación y adhesión. Por otra parte, esta menor adhesión podría

favorecer una menor respuesta inflamatoria del epitelio respiratorio, facilitando la evasión del sistema inmune y la colonización bacteriana. Nuestros datos se encuentran en concordancia con un trabajo previo que muestra que cepas de HiNT de nueva adquisición, aisladas en episodios de exacerbación de pacientes EPOC, se adhieren más eficientemente e inducen una mayor secreción de IL-8 que cepas colonizadoras (Chin *et al.*, 2005). Por otro lado, aislados de *P. aeruginosa* recogidos de pacientes con infección pulmonar crónica, mostraron una menor adhesión e internalización en células A549 que cepas aisladas de pacientes con colonización intermitente. A pesar de esta menor adhesión, los datos muestran que los aislados provocan una estimulación inflamatoria prominente, contribuyendo a la patogénesis de la enfermedad (Hawdon *et al.*, 2010).

Por otro lado, analizamos la formación de biopelículas entre los aislados clínicos analizados. De la misma forma que en el fenotipo de adhesión comentado anteriormente, las cepas que forman parte de *sets* con el mismo perfil de PFGE (pacientes grupo B) mostraron una menor formación de biopelículas que las cepas que forman parte de *sets* con distinto perfil de PFGE (pacientes grupo A). Este resultado es sorprendente, ya que resulta intuitivo establecer una asociación entre cronicidad, adaptación y formación de biopelículas. Nuestros datos se encuentran en concordancia con un trabajo previo que muestra que aislados clínicos seriados de cepas de *P. aeruginosa* en pacientes con fibrosis quística mostraron una gradual menor formación de biopelículas (Lee *et al.*, 2005). Por otro lado, los aislados isogénicos del grupo B estimularon una menor secreción de IL-8 con respecto a las aislados clínicos no isogénicos, mostrando, además de una baja capacidad de adhesión epitelial, una menor respuesta inflamatoria (datos no mostrados).

En resumen, en este estudio analizamos una colección de cepas clínicas aisladas de pacientes que sufren una enfermedad crónica subyacente. Nuestros datos sugieren que puede haber una adaptación bacteriana durante la colonización del hospedador que, entre otros, puede estar asociada con un incremento progresivo de la resistencia a PAs, una baja adhesión epitelial y una escasa capacidad de formación de biopelículas. Dado que la comprensión de las características que provocan esta adaptación es crucial para la formulación de terapias adecuadas frente a la infección crónica asociada a enfermedades respiratorias crónicas como es la EPOC, trabajo futuro abordará este tipo de estudios, no sólo mediante el análisis fenotípico diferencial, sino también a través de la secuenciación del genoma completo de microorganismos de interés, con el objetivo de realizar estudios de genómica funcional que nos aporten información útil en microbiología clínica.

Para profundizar en el establecimiento de asociaciones claras entre genes que codifican enzimas implicadas en la síntesis del LOS y los fenotipos analizados, se empleó una cepa de HiNT cuya estructura de LOS es conocida, y un conjunto de mutantes isogénicos generados en nuestro laboratorio que presentan la molécula de LOS progresivamente truncada. Se analizaron la resistencia del patógeno al ataque bactericida de los PAs y la formación de biopelículas sobre superficies abióticas. Todos los mutantes del LOS analizados, excepto HiNT375 Δ *siaB* mostraron mayor sensibilidad a PxB y β -defensina 1 que la cepa silvestre. La menor resistencia a PAs de HiNT375 Δ *lic1BC* y HiNT375 Δ *sapA* confirman evidencias previas apuntando al papel de PCho y SapA en la resistencia de HiNT a PAs (Lysenko *et al.*, 2000a; Shelton *et al.*, 2011). Por otra parte, los datos obtenidos nos permiten hacer una asociación entre la presencia de digalactosa en la molécula de LOS y la resistencia de HiNT a PAs. Además, a medida que truncamos el LOS de HiNT375, la sensibilidad bacteriana a los péptidos analizados fue mayor. Es posible que a medida que truncamos el LOS de HiNT, las cargas superficiales negativas de la membrana plasmática queden disponibles para interaccionar con moléculas catiónicas. Este estudio constituye el primer análisis sistemático de la implicación de la molécula de LOS en la resistencia de HiNT a PAs, revelando el papel de digalactosa, de las Hep I y III, y de las sustituciones glucídicas en ambas heptosas en la resistencia de HiNT a PAs. Igualmente, los datos obtenidos excluyen el ácido siálico como un factor importante en este fenotipo.

Por otro lado, analizamos la implicación del LOS en la formación de biopelículas por HiNT. Los mutantes HiNT375 Δ *lgtF*, HiNT375 Δ *lic1BC* y HiNT375 Δ *siaB* mostraron una menor capacidad para formar biopelículas en el modelo de microfermentador empleado, respecto a la cepa silvestre. Estos datos confirman evidencias previas que apuntan al papel de PCho y ácido siálico en la formación de biopelículas por HiNT, y muestran la relevancia general de la sustitución glucídica en la Hep I en este fenotipo (Hong *et al.*, 2007b; Juncisek *et al.*, 2005; Swords *et al.*, 2004). Ahora bien, la digalactosa no parece ser responsable de la relevancia de la sustitución glucídica en la Hep I en la formación de biopelículas, ya que HiNT375 Δ *lic2A* formó biopelículas comparables a los de la cepa silvestre. HiNT375 Δ *lpsA* presentó una biopelícula similar a la de la cepa silvestre, lo cual no presenta una explicación evidente, ya que la sustitución de ácido siálico en HiNT375 se localiza en la Hep III y HiNT375 Δ *siaB* muestra una deficiencia clara en su capacidad de formación de biopelícula. El mutante HiNT375 Δ *lgtF* Δ *lpsA* formó una biopelícula similar a los mutantes HiNT375 Δ *lic1BC* y HiNT375 Δ *lgtF*, lo cual refuerza los resultados obtenidos con los mutante sencillos. De forma inesperada, observamos

que HiNT375 Δ opsX, el mutante más truncado de los analizados, que presenta expuesto su Kdo, formó una biopelícula similar a la cepa silvestre. Es posible que el truncamiento severo de la molécula de LOS en este mutante cause cambios en la envoltura celular que compensen las carencias derivadas de la mutación generada en el LOS (McLennan *et al.*, 2008). Por otro lado, HiNT375 Δ opsX es un mutante que tiene expuesta la molécula de Kdo. Un estudio previo indica que una diferencia entre bacterias en fase planctónica y bacterias en fase biopelícula es que extractos celulares de bacterias en fase biopelícula presentan una reacción significativamente mayor frente a un anticuerpo anti-Kdo que bacterias en fase planctónica. Esta observación sugiere que el Kdo puede estar implicado de forma prominente en la formación de biopelículas. HiNT375 Δ opsX tiene expuesto el Kdo, lo cual puede, tanto compensar el efecto deletéreo de la ausencia de sustituciones importantes como son PCho y ácido siálico, como jugar un papel activo *per se* en la formación de biopelículas.

2. MECANISMOS MOLECULARES IMPLICADOS EN LA INVASIÓN EPITELIAL POR HiNT

Al comienzo de este trabajo, era conocido que HiNT es un patógeno oportunista capaz de invadir varios tipos de células no fagocíticas, incluyendo células epiteliales hepáticas, endoteliales, neumocitos tipo II y células de epitelio bronquial (Ahren *et al.*, 2001; Ketterer *et al.*, 1999; Morey *et al.*, 2011; St Geme & Falkow, 1990; St Geme, 2002; Swords *et al.*, 2000; Virji *et al.*, 1991). La entrada de este patógeno en células epiteliales requiere la correcta polimerización del citoesqueleto de microtúbulos, la correcta conformación de las balsas lipídicas, y la activación de la ruta de señalización PI3K-Akt (Morey *et al.*, 2011). HiNT se localiza intracelularmente en un compartimento vacuolar denominado NTHi-CV (del inglés *NTHi-containing vacuole*), en el interior del cual la bacteria no replica. Este compartimento presenta características de endosoma temprano de forma transitoria. El compartimento maduro adquiere los marcadores de endosoma tardío Lamp-1, Lamp-2, CD63 y Rab7, y presenta pH ácido (Morey *et al.*, 2011). La capacidad de adaptarse a la vida intracelular puede proporcionar a los microorganismos un refugio para evadir el reconocimiento por células fagocíticas o por factores humorales del sistema inmune, como el sistema del complemento, los péptidos antimicrobianos, las colectinas o los anticuerpos (Kumar *et al.*, 2009).

En este trabajo, hemos analizado el papel de un conjunto de moléculas y cascadas de señalización de la célula hospedadora A549 en la invasión por HiNT375.

Los resultados obtenidos muestran que la cepa HiNT375 utiliza las integrinas $\beta 1$ y $\alpha 5$ y las tirosina quinasas FAK y Src para entrar en células A549. El proceso de invasión epitelial también requiere caveolina 1, en microdominios de la membrana plasmática ricos en colesterol. Por otra parte, la invasión de HiNT está favorecida por la activación de la GTPasa Rac1, el GEF Vav2 y el efector Pak1. Nuestros resultados sugieren que la activación de Pak1 puede estar asociada a la inactivación del agente desestabilizador de microtúbulos Op18/estatmina, lo que podría facilitar la polimerización del citoesqueleto de microtúbulos, y la entrada bacteriana. Por otro lado, RhoA y su efector ROCK parecen jugar un papel antagonista al de Rac1 en la invasión de células A549 por HiNT375. Este papel antagonista puede estar condicionado por el hecho de que la polimerización del citoesqueleto de actina que puede estar controlada por la señalización RhoA-ROCK, previene la invasión bacteriana. Por otra parte, el control negativo ejercido por RhoA-ROCK puede relacionarse con el hecho de que la inactivación de ROCK restaura el efecto inhibitorio del agente bloqueante de la polimerización de microtúbulos colchicina, lo que sugiere un efecto negativo de ROCK sobre la polimerización de microtúbulos durante la invasión epitelial por HiNT. La activación de Akt mediada por PI3K también participa en la invasión de HiNT375, y este evento requiere la actividad de Rac1 y Src. Por último, niveles altos de AMPc en el citosol eucariota reducen la invasión de HiNT375, un fenómeno ligado a la activación de la quinasa PKA. La **Figura 38** integra la información generada en este trabajo, con el objetivo de mostrar una visión de conjunto de los mecanismos moleculares implicados en la internalización de HiNT375 en células A549.

Las balsas lipídicas son microdominios fluidos de la membrana plasmática que tienen movilidad lateral (Manes *et al.*, 2003). HiNT emplea estos microdominios durante la infección epitelial, dado que la depleción de colesterol de los mismos reduce la entrada bacteriana. Otros patógenos utilizan las balsas lipídicas para invadir células eucariotas, sugiriendo que la invasión mediada por las balsas lipídicas puede ser un proceso generalizado en los patógenos invasivos. Sin embargo, los mecanismos moleculares empleados por distintos microorganismos varían (Zaas *et al.*, 2005). Caveolina 1 tiene un papel determinante en la forma y tamaño de las caveolas, y en la reorganización de moléculas de señalización alrededor de la caveola naciente (Zaas *et al.*, 2005). En este trabajo, mostramos que caveolina 1 está implicada en la invasión de HiNT375. Sin embargo, nuestros datos también muestran que la sobreexpresión de caveolina 1 no favorece la entrada bacteriana, sugiriendo que el equilibrio en la cantidad de caveolina 1 puede condicionar la capacidad de HiNT para invadir la célula hospedadora. Otros patógenos como *E. coli* (Duncan *et al.*, 2004) y *Listeria* (Bonazzi

et al., 2008) requieren caveolina 1 para invadir células no fagocíticas. Por el contrario, la deficiencia de caveolina 1 incrementa la internalización de *S. aureus*, *N. gonorrhoeae* y *E. coli* enteropatógena (Boettcher *et al.*, 2010).

Por otra parte, un número creciente de bacterias utiliza clatrina para invadir células no fagocíticas. *Listeria* usa caveolina 1 y clatrina para entrar en células no fagocíticas (Bonazzi *et al.*, 2008; Veiga & Cossart, 2005), mientras que *Rickettsia* utiliza caveolina 2 y clatrina para invadir las células no fagocíticas (Chan *et al.*, 2009). En cambio, nuestro trabajo muestra que la invasión epitelial por HiNT aumenta en ausencia de clatrina, sugiriendo que la clatrina previene la entrada de HiNT en células epiteliales a través de un mecanismo desconocido.

Las integrinas son moléculas con un papel crítico en numerosos procesos como la adhesión celular a las proteínas de la matriz extracelular, las interacciones célula-célula, y la migración, proliferación y supervivencia celular. Las bacterias utilizan dos tipos de estrategias para activar las integrinas, y así favorecer su internalización: (i) expresan proteínas que se unen directamente a integrinas (invasina de *Yersinia enterocolitica* o *Y. pseudotuberculosis*, Ipa de *Shigella flexneri*, CagL de *Helicobacter pylori*); (ii) expresan proteínas que se unen a proteínas de la matriz extracelular, las cuales a su vez se asocian a las integrinas (*S. aureus*, *Streptococcus pyogenes*, *N. gonorrhoeae*, *N. meningitidis*, *Bartonella henselae*, *M. leprae*). Ambas estrategias no son excluyentes; por ejemplo, *Y. enterocolitica* expresa invasina para unirse a integrina $\beta 1$, y YadA para unirse a la fibronectina de la matriz extracelular (Hoffmann *et al.*, 2011). Nuestros resultados muestran que HiNT375 utiliza las integrinas $\beta 1$ y $\alpha 5$ para invadir células A549. Además, el tratamiento celular con un anticuerpo y un péptido que limitan la unión de posibles ligandos bacterianos a la integrina $\alpha 5$, provoca una reducción de la adhesión e invasión epitelial de HiNT375, lo que sugiere que HiNT puede presentar ligando(s) a través de los cuales la bacteria interacciona directamente con integrina $\alpha 5$. Sin embargo, no podemos descartar una unión indirecta de HiNT a integrinas, ya que HiNT puede unirse a las proteínas de matriz extracelular fibronectina, laminina, colágeno IV y vitronectina (Fink *et al.*, 2002; Hallstrom *et al.*, 2011).

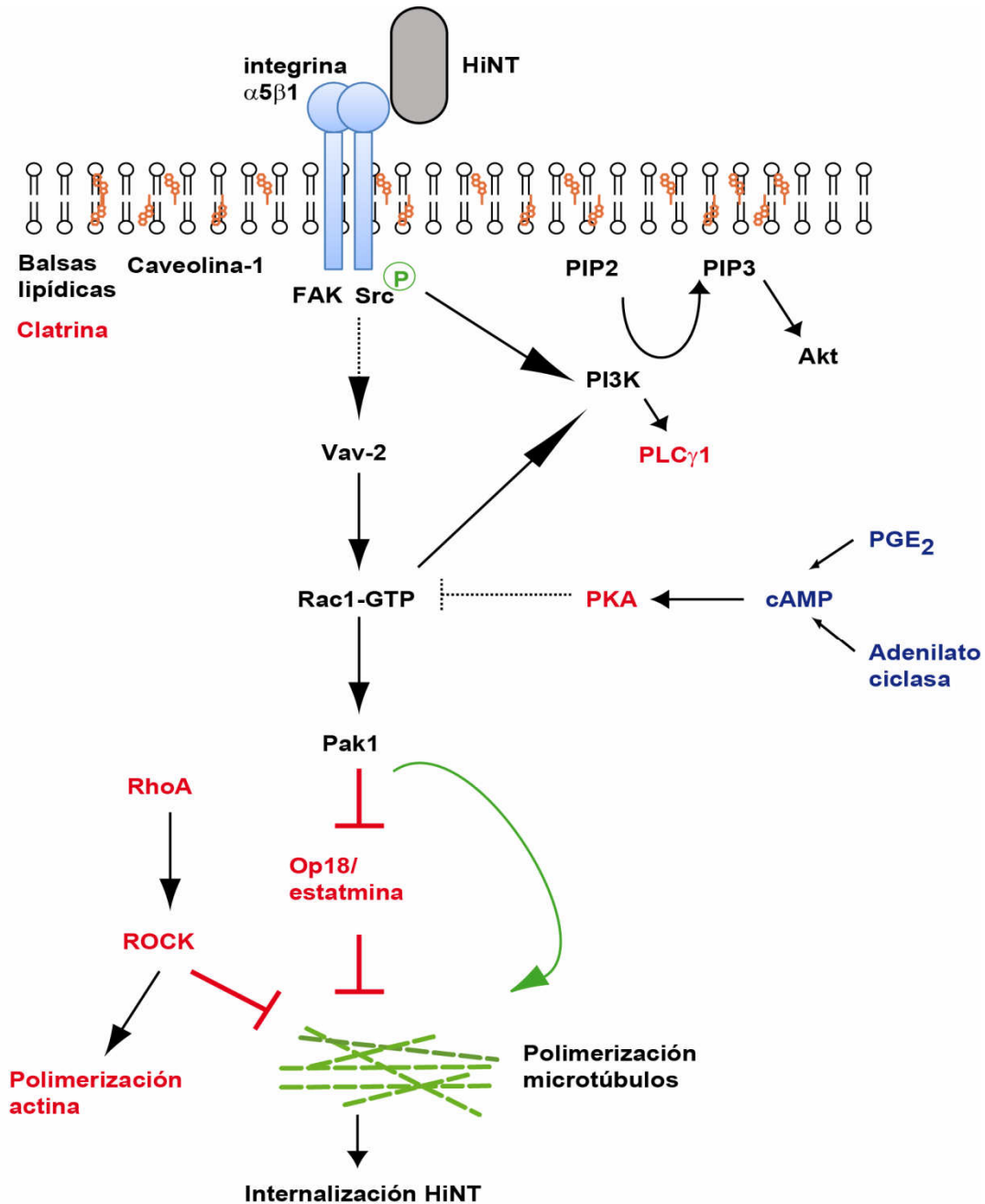


Figura 38. Modelo propuesto para explicar los mecanismos moleculares implicados en la internalización de HiNT375. HiNT375 requiere de las integrinas $\beta 1$ y $\alpha 5$ y de las tirosin quinasas FAK y Src para el proceso de entrada a células A549. Este evento requiere de caveolina 1 de los microdominios de la membrana plasmática ricos en colesterol. La invasión de HiNT está favorecida por la activación de la GTPasa Rac1, junto con el GEF Vav2 y su efector Pak1. La activación de Pak1 estaría asociado a la inactivación del agente destabilizador de los microtúbulos, Op18/estatmina, para facilitar la polimerización de los microtúbulos y la entrada bacteriana. Por otro lado, RhoA y su efector ROCK actúan de forma antagonista a Rac1 en el proceso de invasión de células A549 por HiNT375. La activación de Akt mediada por PI3K también participa en la invasión de HiNT375, y este evento requiere la actividad de Rac1 y Src. Por último, los niveles altos de AMPc citosólico reducen la entrada de HiNT375 a células A549, fenómeno ligado a la activación de PKA.

En nuestro trabajo, hemos hecho extensivas las observaciones respecto al papel de la integrina $\alpha 5$ en la infección epitelial por HiNT375 a un conjunto de aislados clínicos que habían sido caracterizados previamente en nuestro laboratorio (Martí-Llitas *et al.*, 2011). Nuestros datos muestran que la incubación celular con un anticuerpo anti-integrina $\alpha 5$ o con el péptido RGD reduce la adhesión de las cepas HiNT375, HiNT398, HiNT1500, HiNT1560, HiNT1566, HiNT1606, HiNT1619 y HiNT1622. Además, la cepa HiNT86-028NP (aislado de otitis media pediátrica cuyo genoma completo ha sido secuenciado, <http://cmr.jcvi.org/tigr-scripts/CMR/GenomePage.cgi?org=nthi04>, también parece emplear la integrina $\alpha 5$ como receptor celular, a diferencia de la cepa *H. influenzae* Rd KW20, cuya adhesión a células A549 fue similar en ausencia o presencia de anticuerpo anti- $\alpha 5$ integrina y/o péptido RGD (**Fig. 39**). Estas observaciones nos llevaron a plantear la existencia de una distribución diferencial de un posible ligando de integrina $\alpha 5$ entre cepas de HiNT. Dado que los genomas de las cepas Hi Rd KW20 y HiNT86-028NP están disponibles, realizamos una búsqueda *in silico* de genes presentes en HiNT86-028NP y ausentes en Hi Rd KW20 que codifican proteínas con localización subcelular en membrana, y en las cuales encontramos la secuencia RGD. Al realizar esta búsqueda, encontramos que el gen *hmw1A*, que codifica la adhesina HMW1A, cumple estas características. Además, HMW1A presenta homología de secuencia con la proteína FHA de *Bordetella pertussis*. FHA ha sido caracterizada como una adhesina de *B. pertussis* que promueve la invasión epitelial de este patógeno a través de la interacción de su secuencia RGD con la integrina $\alpha 5\beta 1$ (Ishibashi *et al.*, 2001). Estos datos abren la posibilidad de analizar el putativo papel de HMW1A como ligando bacteriano de la integrina $\alpha 5$. Esta línea de trabajo está siendo explotada en nuestro laboratorio en la actualidad.

Por otra parte, en este estudio mostramos que FAK y Src, dos quinasas que actúan de nexo entre integrinas y un conjunto de cascadas de señalización en la célula hospedadora (Guarino, 2010; Mitra *et al.*, 2005), están implicadas en la invasión epitelial por HiNT375. La señalización mediada por integrinas también facilita la unión de Rac1 a sus efectores, como es el caso de Pak1 (del Pozo *et al.*, 2004). Nuestros resultados muestran que la infección de células A549 por HiNT estimula la activación de Rac1, y que tanto Rac1 como Pak1 juegan un papel positivo en la invasión bacteriana. Los GEFs Vav2, DOCK180 y Tiam activan Rac1. Considerando que Src, en su conformación activa, promueve la activación de Vav y Tiam1 (Guarino, 2010), que caveolina 1 interacciona con Vav2 (Boettcher *et al.*, 2010), y que Src y caveolina 1 parecen intervenir en la invasión por HiNT, analizamos el papel de Vav2 en la invasión

epitelial por HiNT. La interferencia de Vav2 confirmó que esta molécula participa en la invasión bacteriana, apoyando que puede ser un GEF de Rac1 durante la invasión de células A549 por HiNT375. La señalización mediada por Rac1 está implicada en la migración celular, al modular la dinámica del citoesqueleto de actina en los lamelipodios (Heasman & Ridley, 2008).

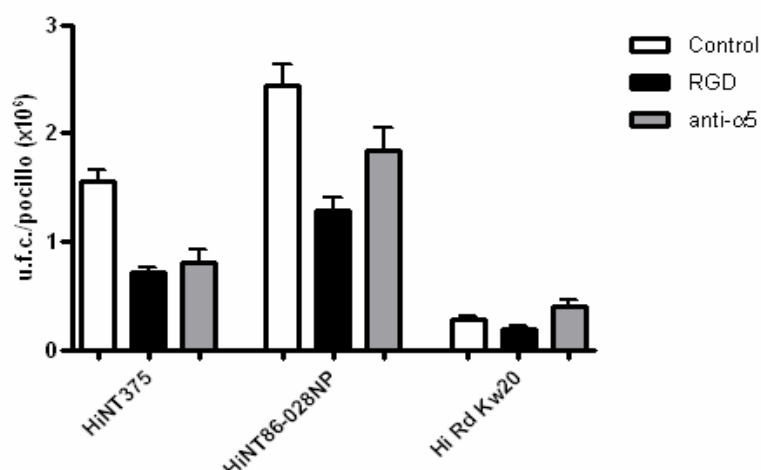


Figura 39. Papel de la integrina $\alpha 5$ en la adhesión epitelial de HiNT375, HiNT86-028NP y Hi Rd KW20. Las células A549 se incubaron con el péptido sintético RGD (columnas en negro) o con el anticuerpo anti-integrina $\alpha 5$ PDI6 (columnas en gris), y se infectaron de forma independiente con las cepas HiNT375, HiNT86-028NP y HiRd HW20. Se cuantificaron los niveles de adhesión bacteriana, comparados con la adhesión a células control, no tratadas (primera columna de cada panel, en blanco). Los datos están mostrados en ufc/pocillo.

Además, Rac1 modula la dinámica de los microtúbulos al promover su elongación, a través de Pak1, que inactiva la proteína desestabilizadora de los microtúbulos Op18/estatmina (Ridley *et al.*, 2003). Nuestros datos sugieren que HiNT manipula la actividad de Rac1 para favorecer su entrada, al facilitar el ensamblaje de los microtúbulos mediante la inactivación Op18/estatmina vía Pak1. Si bien existe una conexión entre Rac1 y Op18/estatmina en el desarrollo axonal de neuronas (Watabe-Uchida *et al.*, 2006), este es el primer estudio que muestra un papel de Op18/estatmina en una interacción patógeno-hospedador.

Por otra parte, Rac1 activa PIP5K, una enzima implicada en la formación de $\text{PtdIns}(4,5)\text{P}_2$ que, a su vez, se convierte en $\text{PtdIns}(3,4,5)\text{P}_3$ en una reacción catalizada por PI3K (Weernink *et al.*, 2004). Nuestros resultados sugieren que, durante la infección epitelial por HiNT, PI3K actúa aguas abajo de Rac1, y que la activación de Akt juega un papel determinante en la invasión epitelial por HiNT. Además, PLC- γ previene la invasión de HiNT, quizás al limitar los niveles $\text{PtdIns}(4,5)\text{P}_2$, un sustrato de PI3K requerido para la activación subsiguiente de Akt.

Un resultado llamativo de este trabajo es que la inhibición de RhoA y ROCK incrementa la invasión bacteriana. Por otro lado, es conocido que RhoA previene la entrada de *N. gonorrhoeae* en células epiteliales a través de un mecanismo en el que interviene caveolina 1. Caveolina 1, en su forma fosforilada, impide la invasión epitelial de *N. gonorrhoeae* al inducir la polimerización del citoesqueleto de actina mediada por Vav2-RhoA (Boettcher *et al.*, 2010). Mecánicamente, hay varias opciones que pueden contribuir a explicar el aumento de invasión epitelial de HiNT observado al bloquear RhoA: (i) la señalización celular vía integrinas puede suprimir la actividad de RhoA en un proceso dependiente de Src (Arthur *et al.*, 2000); (ii) Rac1 puede regular negativamente la actividad de RhoA (Huveneers & Danen, 2009); (iii) la disponibilidad del GEF de RhoA GEF-H1 está regulada por su interacción con el citoesqueleto de microtúbulos en conformación polimerizada (Krendel *et al.*, 2002). Desconocemos si estos u otros eventos de señalización son los responsables de los fenotipos observados. En conjunto, las GTPasas de la familia Rho parecen actuar de forma coordinada en la invasión epitelial por HiNT. Esto podría explicar la ausencia de un efecto detectable en células tratadas con el inhibidor de Rac1, Cdc42 y RhoA toxina B de *C. difficile*. Además, nuestros resultados sugieren una conexión entre Rac1 y RhoA, dado que la inhibición de ROCK restaura el efecto inhibitorio del tratamiento con colchicina en la invasión epitelial por HiNT. Una conexión de este tipo entre ROCK y el citoesqueleto de microtúbulos se ha observado en la regulación de la polaridad migratoria de los leucocitos (Takesono *et al.*, 2010).

Finalmente, mostramos que el incremento de [AMPc] citosólico reduce la invasión epitelial por HiNT375. AMPc activa la quinasa PKA, la cual inhibe Rac1 (Howe, 2004; Nagasawa *et al.*, 2005; O'Connor & Mercurio, 2001; Waschke *et al.*, 2004). Nuestros datos sugieren que la reducción de la tasa de invasión bacteriana observada en células tratadas con forskolin o PGE₂ puede estar relacionada con la activación de PKA, que a su vez limita la activación de Rac1, GTPasa que ha revelado un papel esencial en el proceso de invasión epitelial por HiNT.

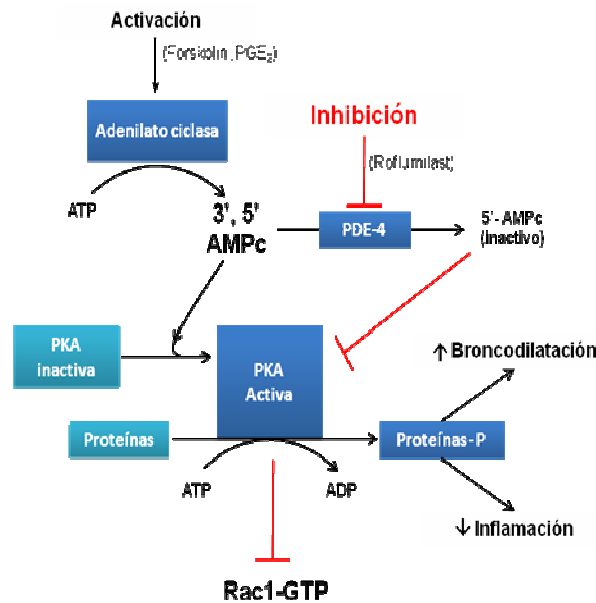


Fig. 40. Modulación de la [AMPc] en una célula eucariota. Altos niveles de AMPc activan la proteína quinasa A (PKA), que cataliza la fosforilación (activación) de intermediarios de rutas de señalización. La activación de estas rutas resulta en un efecto anti-inflamatorio, y conduce a la relajación de la musculatura lisa pulmonar (broncodilatación). Por otro lado, la activación de PKA inhibe a Rac1-GTP. El aumento del nivel de AMPc puede potenciarse por activación de adenilato ciclasas (facilitada de forma exógena por Forskolina o PGE₂), o por inhibición de fosfodiesterasas, PDE (facilitada de forma exógena en la práctica clínica mediante la aplicación de inhibidores de PDE como el roflumilast).

Existen numerosas evidencias que indican la existencia de patógenos que residen en el interior de las células como estrategia de evasión de la inmunidad del hospedador, lo que puede contribuir a la cronificación de la infección. Teniendo en cuenta esta línea argumental, la aplicación de terapias que limiten el acceso de estos microorganismos al interior celular puede constituir una aproximación adecuada frente a este tipo de infecciones. Un ejemplo es el empleo de farmacoterapias que incrementan el nivel de AMPc citosólico en el tratamiento de infecciones persistentes como la provocada por *E. coli* uropatogénica (UPEC). UPEC invade células epiteliales en un proceso que depende de la GTPasa Rac1. Observaciones experimentales indican que el tratamiento de ratones con forskolin favorece la rápida eliminación de UPEC del tracto urinario (Bishop *et al.*, 2007; Song *et al.*, 2007). Por otro lado, el inhibidor de PDE₄ roflumilast (nombre comercial Daxas), que incrementa el AMPc intracelular, es la base de una terapia anti-inflamatoria administrada a pacientes EPOC (Barnes *et al.*, 2005), frecuentemente colonizados por HiNT. El hecho de que el incremento de AMPc citosólico mediante la activación de adenilato ciclasas limite la invasión epitelial por HiNT, sugiere que la inhibición de PDE₄ podría también reducir dicha invasión. Basándonos en la hipótesis de que la localización intracelular de HiNT en células epiteliales puede favorecer la persistencia/cronicidad de la infección, lo que

puede estar a su vez relacionado con la progresión irreversible de enfermedades respiratorias crónicas como la EPOC, la administración de una terapia anti-inflamatoria que al mismo tiempo reduzca la persistencia de la infección crónica por HiNT puede limitar la progresión de la enfermedad respiratoria crónica y quizá contribuir a reducir las exacerbaciones microbianas en este tipo de pacientes.

3. PAPEL DE P5, PCho Y HAP EN LA INFECCIÓN POR HiNT

HiNT expresa diversas moléculas implicadas en estadios iniciales de la infección (Hill *et al.*, 2001; Rao *et al.*, 1999; Swords *et al.*, 2001). En la última parte de este trabajo, analizamos la contribución de P5, Hap y PCho a la infección por HiNT mediante el empleo de cepas mutantes. Si bien excluimos estas tres moléculas como posibles ligandos bacterianos de la integrina $\alpha 5$ o de estructuras glicosiladas de la superficie epitelial, los resultados obtenidos revelan un papel destacado de P5 en la infección por HiNT y generan interrogantes acerca del papel de Hap en la infección por este patógeno respiratorio.

HiNT375 Δ ompP5 mostró niveles de adhesión e invasión epitelial menores que la cepa silvestre al emplear células A549. Igualmente, la infección intranasal murina con esta cepa mutante mostró una tasa de infección pulmonar menor a la obtenida con la cepa silvestre. Estos datos apoyan evidencias previas apuntando al papel de P5 como ligando bacteriano implicado en la infección por HiNT (Avadhanula *et al.*, 2006; Bookwalter *et al.*, 2008; Hill *et al.*, 2001; Reddy *et al.*, 1996; Virji *et al.*, 2000). Sin embargo, datos obtenidos en nuestro laboratorio no corroboran el papel previamente establecido de P5 como ligando bacteriano del receptor eucariota CEACAM-1 (Dra. Begoña Euba, datos no publicados). Así, no hubo diferencias significativas en la adhesión de la cepa silvestre a células HeLa que expresan de forma estable CEACAM-1, respecto a células HeLa control (que no expresan CEACAM-1). Del mismo modo, el mutante carente de P5 no mostró diferencias significativas en la adhesión a células HeLa-CEACAM-1, respecto a células HeLa control. Por otro lado, células A549, que expresan de forma natural CEACAM-1, fueron transfectadas de forma transitoria con dos dsARNi independientes e infectadas con HiNT375. No se apreciaron diferencias en la adhesión de HiNT a células transfectadas y a células control sin transfectar. Asimismo, HiNT375 Δ ompP5 presentó los mismos niveles de adhesión a células A549 en las que se interfirió CEACAM-1 y a células control sin transfectar. En conjunto, estas observaciones sugieren que CEACAM-1 no parece desempeñar un papel esencial en la adhesión epitelial de HiNT, y que P5 puede no ser el ligando de este receptor eucariota, si bien los datos obtenidos sugieren que P5

juega un papel destacado en la infección por HiNT. Por otra parte, HiNT375 Δ *lic1BC* y HiNT375 Δ *hap* presentaron niveles de adhesión e invasión epitelial comparables a los de la cepa silvestre. Estos resultados contrastan con evidencias previas que apuntan la importancia de PCho y Hap en la infección epitelial por HiNT. Si bien desconocemos las razones de la divergencia entre nuestros resultados y datos publicados por otros grupos (Fink *et al.*, 2002; Hendrixson & St Geme, 1998; St Geme, 1994; Swords *et al.*, 2000; Weiser *et al.*, 1998), es necesario indicar que el empleo de cepas distintas y líneas celulares y condiciones experimentales de infección diferentes puede contribuir a las divergencias observadas. HiNT375 Δ *hap* Δ *ompP5* y HiNT375 Δ *hap* Δ *lic1BC* mostraron niveles de adhesión e invasión similares a los de la cepa silvestre.

En cuanto a la capacidad de agregación inter-bacteriana, HiNT375 Δ *hap* mostró una capacidad de agregación menor que la cepa silvestre. Este resultado está de acuerdo con estudios previos que atribuyen a Hap un papel en la formación de agregados de HiNT (Hendrixson & St Geme, 1998). HiNT375 Δ *ompP5* y HiNT375 Δ *lic1BC* agregaron de forma comparable a la cepa silvestre. HiNT375 Δ *hap* Δ *ompP5* y HiNT375 Δ *hap* Δ *lic1BC* agregaron de forma comparable a HiNT375 Δ *hap*, ligeramente más rápido en el caso de HiNT375 Δ *hap* Δ *ompP5*. Estos resultados confirman el papel de Hap en la agregación inter-bacteria y limitan la implicación de P5 y PCho en este fenotipo bacteriano.

La infección intranasal murina con HiNT375 Δ *lic1BC* mostró una tasa de infección pulmonar menor a la obtenida con la cepa silvestre. Por otro lado, la infección intranasal con HiNT375 Δ *hap* y HiNT375 Δ *hap* Δ *lic1BC* mostró tasas de infección pulmonar similares a las de la cepa silvestre. Además, los niveles de HiNT375 Δ *hap* Δ *ompP5* recuperados de los pulmones de ratones infectados, si bien menores a la tasa de recuperación de la cepa silvestre, fueron significativamente mayores a los obtenidos al infectar ratones con el mutante HiNT375 Δ *ompP5*. Los datos obtenidos sugieren que la ausencia de Hap, no solo no altera la infección pulmonar por HiNT375, sino que favorece la infección en ausencia de PCho y P5. Este tipo de observación se ha realizado en el caso de la adhesina YadA de *Y. pseudotuberculosis*, cuyo papel en la adhesión bacteriana a superficies eucariotas ha sido ampliamente caracterizado (Bialas *et al.*, 2012), y cuya ausencia, sin embargo, no provoca defectos aparentes en un modelo de infección murina (Han & Miller, 1997). En conjunto, los resultados obtenidos abren interrogantes acerca de la relevancia biológica de la autoagregación bacteriana asociada a Hap durante la infección pulmonar por HiNT. Trabajo futuro determinará la distribución y conservación de *hap* en aislados clínicos de distinta naturaleza, así como su expresión y actividad en distintos modelos de experimentación.

CONCLUSIONES

1. Cepas clínicas crónicas de HiNT, aisladas de pacientes respiratorios crónicos en visitas consecutivas, presentan un incremento progresivo en su resistencia al ataque bactericida de PAs. Este aumento progresivo de resistencia no está relacionado con la sustitución glucídica presente en la Hep II del LOS, con la presencia de PCho, ni con el grado de acilación del lípido A de la molécula de LOS.
2. Cepas clínicas de HiNT de “nueva adquisición”, aisladas de pacientes respiratorios crónicos en visitas consecutivas, presentan niveles de formación de biopelículas y de adhesión epitelial mayores a los mostrados por aislados clínicos crónicos.
3. El empleo de cepas mutantes que presentan un truncamiento secuencial de la molécula de LOS, generadas a partir de HiNT375, indica la existencia de una relación directamente proporcional entre el truncamiento del LOS y la sensibilidad de HiNT a PAs. El ácido siálico no desempeña un papel prominente en la resistencia de HiNT375 a PAs.
4. El empleo de cepas mutantes de HiNT que presentan un truncamiento secuencial de la molécula de LOS, generadas a partir de HiNT375, indica que ácido siálico y PCho, pero no digalactosa, intervienen en la formación de biopelículas en un modelo de flujo continuo en microfermentador.
5. La invasión epitelial por HiNT requiere la integridad de los microdominios lipídicos de la membrana plasmática de la célula hospedadora, así como de las proteínas caveolina 1 y GTPasa dinamina.
6. La integrina $\beta 1$ está implicada en la invasión del epitelio respiratorio por HiNT. La integrina $\alpha 5$ participa en los eventos de adhesión e invasión epitelial por HiNT. Las moléculas bacterianas PCho, Hap y P5 no son ligandos de integrina $\alpha 5$ durante la infección epitelial por la cepa HiNT375.
7. Tirosina quinasas de la familia Src y la tirosina quinasa FAK participan en la invasión epitelial por HiNT.
8. La señalización Vav2-Rac1-Pak1-Op18/estatmina favorece la invasión epitelial de HiNT a través de la modulación del citoesqueleto de microtúbulos de la célula hospedadora.

- 9.** La internalización epitelial de HiNT está facilitada por la quinasa Akt, que actúa de forma antagónica a la lipasa PLC- γ . La fosforilación de Akt en células infectadas por HiNT depende de tirosina quinasas de la familia Src y de la GTPasa Rac1.
- 10.** La señalización RhoA-ROCK previene la invasión epitelial de HiNT.
- 11.** El incremento de la concentración de AMPc citosólico a través de la activación de adenilato ciclasas, y la activación de la quinasa PKA, previenen la invasión del epitelio respiratorio por HiNT.
- 12.** Cepas clínicas de HiNT no isogénicas, aisladas de individuos no relacionados, presentan una capacidad de adhesión epitelial heterogénea que no está relacionada con la subversión diferencial de integrina $\alpha 5$ ni de residuos de manosa de la célula hospedadora.
- 13.** En la cepa HiNT375, P5 es una adhesina implicada en la adhesión de este patógeno a epitelio respiratorio humano en cultivo y en la infección pulmonar en un modelo de infección intranasal murina.
- 14.** En la cepa HiNT375, Hap es un autotransportador implicado en la autoagregación bacteriana, pero no en la adhesión a epitelio respiratorio humano en cultivo. Asimismo, la ausencia de *hap* restaura la deficiencia mostrada por una cepa carente de *ompP5* en la infección pulmonar en un modelo de infección intranasal murina.

REFERENCIAS

- Abachin, E., Poyart, C., Pellegrini, E., Milohanic, E., Fiedler, F., Berche, P. & Trieu-Cuot, P. (2002).** Formation of D-alanyl-lipoteichoic acid is required for adhesion and virulence of *Listeria monocytogenes*. *Mol Microbiol* **43**, 1-14.
- Abe, K., Rossman, K. L., Liu, B., Ritola, K. D., Chiang, D., Campbell, S. L., Burrridge, K. & Der, C. J. (2000).** Vav2 is an activator of Cdc42, Rac1, and RhoA. *J Biol Chem* **275**, 10141-10149.
- Agarwal, J., Srivastava, S. & Singh, M. (2012).** Pathogenomics of uropathogenic *Escherichia coli*. *Indian J Med Microbiol* **30**, 141-149.
- Agarwal, V., Asmat, T. M., Dierdorf, N. I., Hauck, C. R. & Hammerschmidt, S. (2010).** Polymeric immunoglobulin receptor-mediated invasion of *Streptococcus pneumoniae* into host cells requires a coordinate signaling of SRC family of protein-tyrosine kinases, ERK, and c-Jun N-terminal kinase. *J Biol Chem* **285**, 35615-35623.
- Ahren, I. L., Janson, H., Forsgren, A. & Riesbeck, K. (2001).** Protein D expression promotes the adherence and internalization of non-typeable *Haemophilus influenzae* into human monocytic cells. *Microb Pathog* **31**, 151-158.
- Allen, S., Zaleski, A., Johnston, J. W., Gibson, B. W. & Apicella, M. A. (2005).** Novel sialic acid transporter of *Haemophilus influenzae*. *Infect Immun* **73**, 5291-5300.
- Anderson, R. G. (1998).** The caveolae membrane system. *Annu Rev Biochem* **67**, 199-225.
- Arce, F. T., Carlson, R., Monds, J., Veeh, R., Hu, F. Z., Stewart, P. S., Lal, R., Ehrlich, G. D. & Avci, R. (2009).** Nanoscale structural and mechanical properties of nontypeable *Haemophilus influenzae* biofilms. *J Bacteriol* **191**, 2512-2520.
- Armbruster, C. E., Hong, W., Pang, B., Dew, K. E., Juneau, R. A., Byrd, M. S., Love, C. F., Kock, N. D. & Swords, W. E. (2009).** LuxS promotes biofilm maturation and persistence of nontypeable *Haemophilus influenzae* in vivo via modulation of lipooligosaccharides on the bacterial surface. *Infect Immun* **77**, 4081-4091.
- Arnaout, M. A., Mahalingam, B. & Xiong, J. P. (2005).** Integrin structure, allostery, and bidirectional signaling. *Annu Rev Cell Dev Biol* **21**, 381-410.
- Arthur, W. T., Petch, L. A. & Burrridge, K. (2000).** Integrin engagement suppresses RhoA activity via a c-Src-dependent mechanism. *Curr Biol* **10**, 719-722.
- Avadhanula, V., Rodriguez, C. A., Ulett, G. C., Bakaletz, L. O. & Adderson, E. E. (2006).** Nontypeable *Haemophilus influenzae* adheres to intercellular adhesion molecule 1 (ICAM-1) on respiratory epithelial cells and upregulates ICAM-1 expression. *Infect Immun* **74**, 830-838.
- Bakaletz, L. O., Baker, B. D., Jurecsek, J. A., Harrison, A., Novotny, L. A., Bookwalter, J. E., Mungur, R. & Munson, R. S., Jr. (2005).** Demonstration of Type IV pilus expression and a twitching phenotype by *Haemophilus influenzae*. *Infect Immun* **73**, 1635-1643.
- Bandi, V., Apicella, M. A., Mason, E., Murphy, T. F., Siddiqi, A., Atmar, R. L. & Greenberg, S. B. (2001).** Nontypeable *Haemophilus influenzae* in the lower respiratory tract of patients with chronic bronchitis. *Am J Respir Crit Care Med* **164**, 2114-2119.
- Barenkamp, S. J. (1992).** Outer membrane proteins and lipopolysaccharides of nontypeable *Haemophilus influenzae*. *J Infect Dis* **165 Suppl 1**, S181-184.
- Barenkamp, S. J. (1996).** Immunization with high-molecular-weight adhesion proteins of nontypeable *Haemophilus influenzae* modifies experimental otitis media in chinchillas. *Infect Immun* **64**, 1246-1251.

- Barnes, A. P., Livera, G., Huang, P., Sun, C., O'Neal, W. K., Conti, M., Stutts, M. J. & Milgram, S. L. (2005).** Phosphodiesterase 4D forms a cAMP diffusion barrier at the apical membrane of the airway epithelium. *J Biol Chem* **280**, 7997-8003.
- Barnes, P. J. (2004).** Mediators of chronic obstructive pulmonary disease. *Pharmacol Rev* **56**, 515-548.
- Barnes, P. J. (2007).** Prevention of death in COPD. *N Engl J Med* **356**, 2211; author reply 2213-2214.
- Barnes, P. J. & Celli, B. R. (2009).** Systemic manifestations and comorbidities of COPD. *Eur Respir J* **33**, 1165-1185.
- Barthel, D., Singh, B., Riesbeck, K. & Zipfel, P. F. (2012).** *Haemophilus influenzae* uses the surface protein E to acquire human plasminogen and to evade innate immunity. *J Immunol* **188**, 379-385.
- Benedek, O. & Schubert, S. (2007).** Mobility of the *Yersinia* High-Pathogenicity Island (HPI): transfer mechanisms of pathogenicity islands (PAIS) revisited (a review). *Acta Microbiol Immunol Hung* **54**, 89-105.
- Bialas, N., Kasperkiewicz, K., Radziejewska-Lebrecht, J. & Skurnik, M. (2012).** Bacterial cell surface structures in *Yersinia enterocolitica*. *Arch Immunol Ther Exp (Warsz)* **60**, 199-209.
- Bishop, A. L. & Hall, A. (2000).** Rho GTPases and their effector proteins. *Biochem J* **348 Pt 2**, 241-255.
- Bishop, B. L., Duncan, M. J., Song, J., Li, G., Zaas, D. & Abraham, S. N. (2007).** Cyclic AMP-regulated exocytosis of *Escherichia coli* from infected bladder epithelial cells. *Nat Med* **13**, 625-630.
- Blaser, M. J. & Falkow, S. (2009).** What are the consequences of the disappearing human microbiota? *Nat Rev Microbiol* **7**, 887-894.
- Boettcher, J. P., Kirchner, M., Churin, Y., Kaushansky, A., Pombaiah, M., Thorn, H., Brinkmann, V., Macbeath, G. & Meyer, T. F. (2010).** Tyrosine-phosphorylated caveolin-1 blocks bacterial uptake by inducing Vav2-RhoA-mediated cytoskeletal rearrangements. *PLoS Biol* **8**.
- Bonazzi, M., Veiga, E., Pizarro-Cerda, J. & Cossart, P. (2008).** Successive post-translational modifications of E-cadherin are required for InlA-mediated internalization of *Listeria monocytogenes*. *Cell Microbiol* **10**, 2208-2222.
- Bookwalter, J. E., Juncisek, J. A., Gray-Owen, S. D., Fernandez, S., McGillivray, G. & Bakaletz, L. O. (2008).** A carcinoembryonic antigen-related cell adhesion molecule 1 homologue plays a pivotal role in nontypeable *Haemophilus influenzae* colonization of the chinchilla nasopharynx via the outer membrane protein P5-homologous adhesin. *Infect Immun* **76**, 48-55.
- Bouchet, V., Hood, D. W., Li, J. & other authors (2003).** Host-derived sialic acid is incorporated into *Haemophilus influenzae* lipopolysaccharide and is a major virulence factor in experimental otitis media. *Proc Natl Acad Sci U S A* **100**, 8898-8903.
- Boyle, E. C., Brown, N. F. & Finlay, B. B. (2006).** *Salmonella enterica* serovar Typhimurium effectors SopB, SopE, SopE2 and SipA disrupt tight junction structure and function. *Cell Microbiol* **8**, 1946-1957.
- Bresser, P., van Alphen, L., Habets, F. J., Hart, A. A., Dankert, J., Jansen, H. M. & Lutter, R. (1997).** Persisting *Haemophilus influenzae* strains induce lower levels of interleukin-6 and

interleukin-8 in H292 lung epithelial cells than nonpersisting strains. *Eur Respir J* **10**, 2319-2326.

Brogden, K. A. (2005). Antimicrobial peptides: pore formers or metabolic inhibitors in bacteria? *Nat Rev Microbiol* **3**, 238-250.

Brugha, R. E. & Davies, J. C. (2011). *Pseudomonas aeruginosa* in cystic fibrosis: pathogenesis and new treatments. *Br J Hosp Med (Lond)* **72**, 614-619.

Byrd, S. R., Gelber, R. & Bermudez, L. E. (1993). Roles of soluble fibronectin and beta 1 integrin receptors in the binding of *Mycobacterium leprae* to nasal epithelial cells. *Clin Immunol Immunopathol* **69**, 266-271.

Cantley, L. C. (2002). The phosphoinositide 3-kinase pathway. *Science* **296**, 1655-1657.

Carabeo, R. (2011). Bacterial subversion of host actin dynamics at the plasma membrane. *Cell Microbiol* **13**, 1460-1469.

Carruthers, M. D., Tracy, E. N., Dickson, A. C., Ganser, K. B., Munson, R. S., Jr. & Bakaletz, L. O. (2012). Biological roles of nontypeable *Haemophilus influenzae* type IV pilus proteins encoded by the pil and com operons. *J Bacteriol* **194**, 1927-1933.

Castranova, V., Rabovsky, J., Tucker, J. H. & Miles, P. R. (1988). The alveolar type II epithelial cell: a multifunctional pneumocyte. *Toxicol Appl Pharmacol* **93**: 472-483.

Caswell, C. C., Lukomska, E., Seo, N. S., Hook, M. & Lukowski, S. (2007). Scl1-dependent internalization of group A *Streptococcus* via direct interactions with the alpha2beta(1) integrin enhances pathogen survival and re-emergence. *Mol Microbiol* **64**, 1319-1331.

Caswell, P. T., Vadrevu, S. & Norman, J. C. (2009). Integrins: masters and slaves of endocytic transport. *Nat Rev Mol Cell Biol* **10**, 843-853.

Celli, B. R. & Barnes, P. J. (2007). Exacerbations of chronic obstructive pulmonary disease. *Eur Respir J* **29**, 1224-1238.

Celli, J., Olivier, M. & Finlay, B. B. (2001). Enteropathogenic *Escherichia coli* mediates antiphagocytosis through the inhibition of PI 3-kinase-dependent pathways. *EMBO J* **20**, 1245-1258.

Clark, S. E., Snow, J., Li, J., Zola, T. A. & Weiser, J. N. (2012). Phosphorylcholine allows for evasion of bactericidal antibody by *Haemophilus influenzae*. *PLoS Pathog* **8**, e1002521.

Clay, C. D., Soni, S., Gunn, J. S. & Schlesinger, L. S. (2008). Evasion of complement-mediated lysis and complement C3 deposition are regulated by *Francisella tularensis* lipopolysaccharide O antigen. *J Immunol* **181**, 5568-5578.

Cole, J. N., Pence, M. A., von Kockritz-Blickwede, M., Hollands, A., Gallo, R. L., Walker, M. J. & Nizet, V. (2010). M protein and hyaluronic acid capsule are essential for in vivo selection of covRS mutations characteristic of invasive serotype M1T1 group A *Streptococcus*. *MBio* **1**.

Conradi, J., Tegtmeyer, N., Wozna, M. & other authors (2012). An RGD Helper Sequence in CagL of *Helicobacter pylori* Assists in Interactions with Integrins and Injection of CagA. *Front Cell Infect Microbiol* **2**, 70.

Cosio, M. G., Saetta, M. & Agusti, A. (2009). Immunologic aspects of chronic obstructive pulmonary disease. *N Engl J Med* **360**, 2445-2454.

Cossart, P. & Sansonetti, P. J. (2004). Bacterial invasion: the paradigms of enteroinvasive pathogens. *Science* **304**, 242-248.

- Costerton, J. W. (1995).** Overview of microbial biofilms. *J Ind Microbiol* **15**, 137-140.
- Chan, Y. G., Cardwell, M. M., Hermanas, T. M., Uchiyama, T. & Martinez, J. J. (2009).** Rickettsial outer-membrane protein B (rOmpB) mediates bacterial invasion through Ku70 in an actin, c-Cbl, clathrin and caveolin 2-dependent manner. *Cell Microbiol* **11**, 629-644.
- Checroun, C., Wehrly, T. D., Fischer, E. R., Hayes, S. F. & Celli, J. (2006).** Autophagy-mediated reentry of *Francisella tularensis* into the endocytic compartment after cytoplasmic replication. *Proc Natl Acad Sci U S A* **103**, 14578-14583.
- Cheung, G. Y., Rigby, K., Wang, R., Queck, S. Y., Braughton, K. R., Whitney, A. R., Teintze, M., DeLeo, F. R. & Otto, M. (2010).** *Staphylococcus epidermidis* strategies to avoid killing by human neutrophils. *PLoS Pathog* **6**, e1001133.
- Chin, C. L., Manzel, L. J., Lehman, E. E. & other authors (2005).** *Haemophilus influenzae* from patients with chronic obstructive pulmonary disease exacerbation induce more inflammation than colonizers. *Am J Respir Crit Care Med* **172**, 85-91.
- Cholon, D. M., Cutter, D., Richardson, S. K., Sethi, S., Murphy, T. F., Look, D. C. & St Geme, J. W., 3rd (2008).** Serial isolates of persistent *Haemophilus influenzae* in patients with chronic obstructive pulmonary disease express diminishing quantities of the HMW1 and HMW2 adhesins. *Infect Immun* **76**, 4463-4468.
- Daub, H., Gevaert, K., Vandekerckhove, J., Sobel, A. & Hall, A. (2001).** Rac/Cdc42 and p65PAK regulate the microtubule-destabilizing protein stathmin through phosphorylation at serine 16. *J Biol Chem* **276**, 1677-1680.
- Dawid, S., Barenkamp, S. J. & St Geme, J. W., 3rd (1999).** Variation in expression of the *Haemophilus influenzae* HMW adhesins: a prokaryotic system reminiscent of eukaryotes. *Proc Natl Acad Sci U S A* **96**, 1077-1082.
- Deadman, M. E., Lundstrom, S. L., Schweda, E. K., Moxon, E. R. & Hood, D. W. (2006).** Specific amino acids of the glycosyltransferase LpsA direct the addition of glucose or galactose to the terminal inner core heptose of *Haemophilus influenzae* lipopolysaccharide via alternative linkages. *J Biol Chem* **281**, 29455-29467.
- Deadman, M. E., Hermant, P., Engskog, M., Makepeace, K., Moxon, E. R., Schweda, E. K. & Hood, D. W. (2009).** Lex2B, a phase-variable glycosyltransferase, adds either a glucose or a galactose to *Haemophilus influenzae* lipopolysaccharide. *Infect Immun* **77**, 2376-2384.
- del Pozo, M. A., Alderson, N. B., Kiosses, W. B., Chiang, H. H., Anderson, R. G. & Schwartz, M. A. (2004).** Integrins regulate Rac targeting by internalization of membrane domains. *Science* **303**, 839-842.
- del Pozo, M. A., Balasubramanian, N., Alderson, N. B., Kiosses, W. B., Grande-Garcia, A., Anderson, R. G. & Schwartz, M. A. (2005).** Phospho-caveolin-1 mediates integrin-regulated membrane domain internalization. *Nat Cell Biol* **7**, 901-908.
- DeMaria, T. F., Apicella, M. A., Nichols, W. A. & Leake, E. R. (1997).** Evaluation of the virulence of nontypeable *Haemophilus influenzae* lipooligosaccharide htrB and rfaD mutants in the chinchilla model of otitis media. *Infect Immun* **65**, 4431-4435.
- Di Paolo, G. & De Camilli, P. (2006).** Phosphoinositides in cell regulation and membrane dynamics. *Nature* **443**, 651-657.
- Dougherty, B. A. & Smith, H. O. (1999).** Identification of *Haemophilus influenzae* Rd transformation genes using cassette mutagenesis. *Microbiology* **145 (Pt 2)**, 401-409.

- Drannik, A. G., Pouladi, M. A., Robbins, C. S., Goncharova, S. I., Kianpour, S. & Stampfli, M. R. (2004).** Impact of cigarette smoke on clearance and inflammation after *Pseudomonas aeruginosa* infection. *Am J Respir Crit Care Med* **170**, 1164-1171.
- Duim, B., van Alphen, L., Eijk, P., Jansen, H. M. & Dankert, J. (1994).** Antigenic drift of non-encapsulated *Haemophilus influenzae* major outer membrane protein P2 in patients with chronic bronchitis is caused by point mutations. *Mol Microbiol* **11**, 1181-1189.
- Duim, B., Bowler, L. D., Eijk, P. P., Jansen, H. M., Dankert, J. & van Alphen, L. (1997).** Molecular variation in the major outer membrane protein P5 gene of nonencapsulated *Haemophilus influenzae* during chronic infections. *Infect Immun* **65**, 1351-1356.
- Duncan, M. J., Li, G., Shin, J. S., Carson, J. L. & Abraham, S. N. (2004).** Bacterial penetration of bladder epithelium through lipid rafts. *J Biol Chem* **279**, 18944-18951.
- Echarri, A., Muriel, O. & Del Pozo, M. A. (2007).** Intracellular trafficking of raft/caveolae domains: insights from integrin signaling. *Semin Cell Dev Biol* **18**, 627-637.
- Edwards, D. C., Sanders, L. C., Bokoch, G. M. & Gill, G. N. (1999).** Activation of LIM-kinase by Pak1 couples Rac/Cdc42 GTPase signalling to actin cytoskeletal dynamics. *Nat Cell Biol* **1**, 253-259.
- Ehrlich, G. D., Veeh, R., Wang, X., Costerton, J. W., Hayes, J. D., Hu, F. Z., Daigle, B. J., Ehrlich, M. D. & Post, J. C. (2002).** Mucosal biofilm formation on middle-ear mucosa in the chinchilla model of otitis media. *JAMA* **287**, 1710-1715.
- Erwin, A. L., Nelson, K. L., Mhlanga-Mutangadura, T. & other authors (2005).** Characterization of genetic and phenotypic diversity of invasive nontypeable *Haemophilus influenzae*. *Infect Immun* **73**, 5853-5863.
- Erwin, A. L., Allen, S., Ho, D. K. & other authors (2006a).** Role of IgtC in resistance of nontypeable *Haemophilus influenzae* strain R2866 to human serum. *Infect Immun* **74**, 6226-6235.
- Erwin, A. L., Bonthuis, P. J., Geelhood, J. L., Nelson, K. L., McCrea, K. W., Gilsdorf, J. R. & Smith, A. L. (2006b).** Heterogeneity in tandem octanucleotides within *Haemophilus influenzae* lipopolysaccharide biosynthetic gene *losA* affects serum resistance. *Infect Immun* **74**, 3408-3414.
- Erwin, A. L., Sandstedt, S. A., Bonthuis, P. J. & other authors (2008).** Analysis of genetic relatedness of *Haemophilus influenzae* isolates by multilocus sequence typing. *J Bacteriol* **190**, 1473-1483.
- Etienne-Manneville, S. & Hall, A. (2002).** Rho GTPases in cell biology. *Nature* **420**, 629-635.
- Evans, M. E., Feola, D. J. & Rapp, R. P. (1999).** Polymyxin B sulfate and colistin: old antibiotics for emerging multiresistant gram-negative bacteria. *Ann Pharmacother* **33**, 960-967.
- Fang, K. M., Shu, W. H., Chang, H. C., Wang, J. J. & Mak, O. T. (2004).** Study of prostaglandin receptors in mitochondria on apoptosis of human lung carcinoma cell line A549. *Biochem Soc Trans* **32**, 1078-1080.
- Fanning, S., Hall, L. J., Cronin, M. & other authors (2012).** Bifidobacterial surface-exopolysaccharide facilitates commensal-host interaction through immune modulation and pathogen protection. *Proc Natl Acad Sci U S A* **109**, 2108-2113.
- Fereol, S., Fodil, R., Pelle, G., Louis, B. & Isabey, D. (2008).** Cell mechanics of alveolar epithelial cells (AECs) and macrophages (AMs). *Respir Physiol Neurobiol* **163**: 3-16

- Ferguson, M. L., Prasad, K., Boukari, H., Sackett, D. L., Krueger, S., Lafer, E. M. & Nossal, R. (2008).** Clathrin triskelia show evidence of molecular flexibility. *Biophys J* **95**, 1945-1955.
- Fernaays, M. M., Lesse, A. J., Sethi, S., Cai, X. & Murphy, T. F. (2006).** Differential genome contents of nontypeable *Haemophilus influenzae* strains from adults with chronic obstructive pulmonary disease. *Infect Immun* **74**, 3366-3374.
- Figueira, M. A., Ram, S., Goldstein, R., Hood, D. W., Moxon, E. R. & Pelton, S. I. (2007).** Role of complement in defense of the middle ear revealed by restoring the virulence of nontypeable *Haemophilus influenzae* siaB mutants. *Infect Immun* **75**, 325-333.
- Fink, D. L., Green, B. A. & St Geme, J. W., 3rd (2002).** The *Haemophilus influenzae* Hap autotransporter binds to fibronectin, laminin, and collagen IV. *Infect Immun* **70**, 4902-4907.
- Fleischmann, R. D., Adams, M. D., White, O. & other authors (1995).** Whole-genome random sequencing and assembly of *Haemophilus influenzae* Rd. *Science* **269**, 496-512.
- Forbes, K. J., Bruce, K. D., Ball, A. & Pennington, T. H. (1992).** Variation in length and sequence of porin (*ompP2*) alleles of non-capsulate *Haemophilus influenzae*. *Mol Microbiol* **6**, 2107-2112.
- Forsgren, J., Samuelson, A., Ahlin, A., Jonasson, J., Rynnel-Dagoo, B. & Lindberg, A. (1994).** *Haemophilus influenzae* resides and multiplies intracellularly in human adenoid tissue as demonstrated by in situ hybridization and bacterial viability assay. *Infect Immun* **62**, 673-679.
- Fowler, T., Wann, E. R., Joh, D., Johansson, S., Foster, T. J. & Hook, M. (2000).** Cellular invasion by *Staphylococcus aureus* involves a fibronectin bridge between the bacterial fibronectin-binding MSCRAMMs and host cell beta1 integrins. *Eur J Cell Biol* **79**, 672-679.
- Fowler, T., Johansson, S., Wary, K. K. & Hook, M. (2003).** Src kinase has a central role in in vitro cellular internalization of *Staphylococcus aureus*. *Cell Microbiol* **5**, 417-426.
- Fox, K. L., Yildirim, H. H., Deadman, M. E., Schweda, E. K., Moxon, E. R. & Hood, D. W. (2005).** Novel lipopolysaccharide biosynthetic genes containing tetranucleotide repeats in *Haemophilus influenzae*, identification of a gene for adding O-acetyl groups. *Mol Microbiol* **58**, 207-216.
- Fox, K. L., Cox, A. D., Gilbert, M., Wakarchuk, W. W., Li, J., Makepeace, K., Richards, J. C., Moxon, E. R. & Hood, D. W. (2006).** Identification of a bifunctional lipopolysaccharide sialyltransferase in *Haemophilus influenzae*: incorporation of disialic acid. *J Biol Chem* **281**, 40024-40032.
- Fox, K. L., Dowideit, S. J., Erwin, A. L., Srikhanta, Y. N., Smith, A. L. & Jennings, M. P. (2007).** *Haemophilus influenzae* phasevarions have evolved from type III DNA restriction systems into epigenetic regulators of gene expression. *Nucleic Acids Res* **35**, 5242-5252.
- Fox, K. L., Li, J., Schweda, E. K., Vitiazeva, V., Makepeace, K., Jennings, M. P., Moxon, E. R. & Hood, D. W. (2008).** Duplicate copies of *lic1* direct the addition of multiple phosphocholine residues in the lipopolysaccharide of *Haemophilus influenzae*. *Infect Immun* **76**, 588-600.
- Fugier, E., Salcedo, S. P., de Chastellier, C., Pophillat, M., Muller, A., Arce-Gorvel, V., Fourquet, P. & Gorvel, J. P. (2009).** The glyceraldehyde-3-phosphate dehydrogenase and the small GTPase Rab 2 are crucial for *Brucella* replication. *PLoS Pathog* **5**, e1000487.
- Garcia-Rodriguez, J. A. & Fresnadillo Martinez, M. J. (2002).** Dynamics of nasopharyngeal colonization by potential respiratory pathogens. *J Antimicrob Chemother* **50 Suppl S2**, 59-73.
- Gartner, L. P & Hiatt, J. L. (2002).** *Histología, texto y atlas*. México. McGraw-Hill Interamericana.

- Gilsdorf, J. R., McCrea, K. W. & Marrs, C. F. (1997).** Role of pili in *Haemophilus influenzae* adherence and colonization. *Infect Immun* **65**, 2997-3002.
- Giufre, M., Carattoli, A., Cardines, R., Mastrantonio, P. & Cerquetti, M. (2008).** Variation in expression of HMW1 and HMW2 adhesins in invasive nontypeable *Haemophilus influenzae* isolates. *BMC Microbiol* **8**, 83.
- Goodman, S. D., Obergefell, K. P., Jurcisek, J. A. & other authors (2011).** Biofilms can be dispersed by focusing the immune system on a common family of bacterial nucleoid-associated proteins. *Mucosal Immunol* **4**, 625-637.
- Gould, J. M. & Weiser, J. N. (2002).** The inhibitory effect of C-reactive protein on bacterial phosphorylcholine platelet-activating factor receptor-mediated adherence is blocked by surfactant. *J Infect Dis* **186**, 361-371.
- Grass, S., Lichti, C. F., Townsend, R. R., Gross, J. & St Geme, J. W., 3rd (2010).** The *Haemophilus influenzae* HMW1C protein is a glycosyltransferase that transfers hexose residues to asparagine sites in the HMW1 adhesin. *PLoS Pathog* **6**, e1000919.
- Gray-Owen, S. D. & Blumberg, R. S. (2006).** CEACAM1: contact-dependent control of immunity. *Nat Rev Immunol* **6**, 433-446.
- Griffin, R., Bayliss, C. D., Herbert, M. A., Cox, A. D., Makepeace, K., Richards, J. C., Hood, D. W. & Moxon, E. R. (2005).** Digalactoside expression in the lipopolysaccharide of *Haemophilus influenzae* and its role in intravascular survival. *Infect Immun* **73**, 7022-7026.
- Gronow, S., Brabetz, W., Lindner, B. & Brade, H. (2005).** OpsX from *Haemophilus influenzae* represents a novel type of heptosyltransferase I in lipopolysaccharide biosynthesis. *J Bacteriol* **187**, 6242-6247.
- Gruenberg, J. & van der Goot, F. G. (2006).** Mechanisms of pathogen entry through the endosomal compartments. *Nat Rev Mol Cell Biol* **7**, 495-504.
- Guarino, M. (2010).** Src signaling in cancer invasion. *J Cell Physiol* **223**, 14-26.
- Gump, D. W., Phillips, C. A., Forsyth, B. R., McIntosh, K., Lamborn, K. R. & Stouch, W. H. (1976).** Role of infection in chronic bronchitis. *Am Rev Respir Dis* **113**, 465-474.
- Guner, E. S. (1996).** Complement evasion by the Lyme disease spirochete *Borrelia burgdorferi* grown in host-derived tissue co-cultures: role of fibronectin in complement-resistance. *Experientia* **52**, 364-372.
- Guyton, A. C. (2006).** *Fisiología humana*. México. Interamericana.
- Guo, L., Zhang, F., Cai, Y. & Liu, T. (2009).** Expression profiling of integrins in lung cancer cells. *Pathol Res Pract* **205**, 847-853.
- Haas, A. (2007).** The phagosome: compartment with a license to kill. *Traffic* **8**, 311-330.
- Hallstrom, T., Blom, A. M., Zipfel, P. F. & Riesbeck, K. (2009).** Nontypeable *Haemophilus influenzae* protein E binds vitronectin and is important for serum resistance. *J Immunol* **183**, 2593-2601.
- Hallstrom, T. & Riesbeck, K. (2010).** *Haemophilus influenzae* and the complement system. *Trends Microbiol* **18**, 258-265.
- Hallstrom, T., Singh, B., Resman, F., A, M. B., Morgelin, M. & Riesbeck, K. (2011).** *Haemophilus influenzae* Protein E Binds to the Extracellular Matrix by Concurrently Interacting with Laminin and Vitronectin. *J Infect Dis* **204**, 1065-1074.

- Han, Y. W. & Miller, V. L. (1997).** Reevaluation of the virulence phenotype of the *inv yadA* double mutants of *Yersinia pseudotuberculosis*. *Infect Immun* **65**, 327-330.
- Hancock, R. E. & Chapple, D. S. (1999).** Peptide antibiotics. *Antimicrob Agents Chemother* **43**, 1317-1323.
- Harvey, H. A., Swords, W. E. & Apicella, M. A. (2001).** The mimicry of human glycolipids and glycosphingolipids by the lipooligosaccharides of pathogenic *Neisseria* and *Haemophilus*. *J Autoimmun* **16**, 257-262.
- Hawdon, N. A., Aval, P. S., Barnes, R. J. & other authors (2010).** Cellular responses of A549 alveolar epithelial cells to serially collected *Pseudomonas aeruginosa* from cystic fibrosis patients at different stages of pulmonary infection. *FEMS Immunol Med Microbiol* **59**, 207-220.
- Heasman, S. J. & Ridley, A. J. (2008).** Mammalian Rho GTPases: new insights into their functions from in vivo studies. *Nat Rev Mol Cell Biol* **9**, 690-701.
- Hebrard, M., Viala, J. P., Meresse, S., Barras, F. & Aussel, L. (2009).** Redundant hydrogen peroxide scavengers contribute to *Salmonella* virulence and oxidative stress resistance. *J Bacteriol* **191**, 4605-4614.
- Henderson, I. R., Cappello, R. & Nataro, J. P. (2000).** Autotransporter proteins, evolution and redefining protein secretion: response. *Trends Microbiol* **8**, 534-535.
- Hendrixson, D. R. & St Geme, J. W., 3rd (1998).** The *Haemophilus influenzae* Hap serine protease promotes adherence and microcolony formation, potentiated by a soluble host protein. *Mol Cell* **2**, 841-850.
- Hermesen, E. D., Sullivan, C. J. & Rotschafer, J. C. (2003).** Polymyxins: pharmacology, pharmacokinetics, pharmacodynamics, and clinical applications. *Infect Dis Clin North Am* **17**, 545-562.
- High, N., Mounier, J., Prevost, M. C. & Sansonetti, P. J. (1992).** IpaB of *Shigella flexneri* causes entry into epithelial cells and escape from the phagocytic vacuole. *EMBO J* **11**, 1991-1999.
- Hiltke, T. J., Schiffmacher, A. T., Dagonese, A. J., Sethi, S. & Murphy, T. F. (2003).** Horizontal transfer of the gene encoding outer membrane protein P2 of nontypeable *Haemophilus influenzae*, in a patient with chronic obstructive pulmonary disease. *J Infect Dis* **188**, 114-117.
- Hill, D. J., Toleman, M. A., Evans, D. J., Villullas, S., Van Alphen, L. & Virji, M. (2001).** The variable P5 proteins of typeable and non-typeable *Haemophilus influenzae* target human CEACAM1. *Mol Microbiol* **39**, 850-862.
- Ho, D. K., Ram, S., Nelson, K. L., Bonthuis, P. J. & Smith, A. L. (2007).** IgtC expression modulates resistance to C4b deposition on an invasive nontypeable *Haemophilus influenzae*. *J Immunol* **178**, 1002-1012.
- Hoffmann, C., Berking, A., Agerer, F., Buntru, A., Neske, F., Chhatwal, G. S., Ohlsen, K. & Hauck, C. R. (2010).** Caveolin limits membrane microdomain mobility and integrin-mediated uptake of fibronectin-binding pathogens. *J Cell Sci* **123**, 4280-4291.
- Hoffmann, C., Ohlsen, K. & Hauck, C. R. (2011).** Integrin-mediated uptake of fibronectin-binding bacteria. *Eur J Cell Biol*.
- Hogg, J. S., Hu, F. Z., Janto, B., Boissy, R., Hayes, J., Keefe, R., Post, J. C. & Ehrlich, G. D. (2007).** Characterization and modeling of the *Haemophilus influenzae* core and supragenomes based on the complete genomic sequences of Rd and 12 clinical nontypeable strains. *Genome Biol* **8**, R103.

- Hong, W., Mason, K., Jurgisek, J., Novotny, L., Bakaletz, L. O. & Swords, W. E. (2007a).** Phosphorylcholine decreases early inflammation and promotes the establishment of stable biofilm communities of nontypeable *Haemophilus influenzae* strain 86-028NP in a chinchilla model of otitis media. *Infect Immun* **75**, 958-965.
- Hong, W., Pang, B., West-Barnette, S. & Swords, W. E. (2007b).** Phosphorylcholine expression by nontypeable *Haemophilus influenzae* correlates with maturation of biofilm communities in vitro and in vivo. *J Bacteriol* **189**, 8300-8307.
- Hood, D. W., Deadman, M. E., Allen, T. & other authors (1996).** Use of the complete genome sequence information of *Haemophilus influenzae* strain Rd to investigate lipopolysaccharide biosynthesis. *Mol Microbiol* **22**, 951-965.
- Hood, D. W., Makepeace, K., Deadman, M. E., Rest, R. F., Thibault, P., Martin, A., Richards, J. C. & Moxon, E. R. (1999a).** Sialic acid in the lipopolysaccharide of *Haemophilus influenzae*: strain distribution, influence on serum resistance and structural characterization. *Mol Microbiol* **33**, 679-692.
- Hood, D. W., Richards, J. C. & Moxon, E. R. (1999b).** *Haemophilus influenzae* lipopolysaccharide. *Biochem Soc Trans* **27**, 493-498.
- Hood, D. W., Cox, A. D., Gilbert, M. & other authors (2001).** Identification of a lipopolysaccharide alpha-2,3-sialyltransferase from *Haemophilus influenzae*. *Mol Microbiol* **39**, 341-350.
- Hood, D. W., Deadman, M. E., Cox, A. D., Makepeace, K., Martin, A., Richards, J. C. & Moxon, E. R. (2004a).** Three genes, lgtF, lic2C and lpsA, have a primary role in determining the pattern of oligosaccharide extension from the inner core of *Haemophilus influenzae* LPS. *Microbiology* **150**, 2089-2097.
- Hood, D. W., Randle, G., Cox, A. D., Makepeace, K., Li, J., Schweda, E. K., Richards, J. C. & Moxon, E. R. (2004b).** Biosynthesis of cryptic lipopolysaccharide glycoforms in *Haemophilus influenzae* involves a mechanism similar to that required for O-antigen synthesis. *J Bacteriol* **186**, 7429-7439.
- Hood, D. W., Deadman, M. E., Engskog, M. K., Vitiazeva, V., Makepeace, K., Schweda, E. K. & Moxon, R. (2010).** Genes required for the synthesis of heptose-containing oligosaccharide outer core extensions in *Haemophilus influenzae* lipopolysaccharide. *Microbiology* **156**, 3421-3431.
- Howe, A. K. (2004).** Regulation of actin-based cell migration by cAMP/PKA. *Biochim Biophys Acta* **1692**, 159-174.
- Hull, M. W. & Chow, A. W. (2007).** Indigenous microflora and innate immunity of the head and neck. *Infect Dis Clin North Am* **21**, 265-282, v.
- Huveneers, S. & Danen, E. H. (2009).** Adhesion signaling - crosstalk between integrins, Src and Rho. *J Cell Sci* **122**, 1059-1069.
- Ishibashi, Y., Relman, D. A. & Nishikawa, A. (2001).** Invasion of human respiratory epithelial cells by *Bordetella pertussis*: possible role for a filamentous hemagglutinin Arg-Gly-Asp sequence and alpha5beta1 integrin. *Microb Pathog* **30**, 279-288.
- Islam, D., Bandholtz, L., Nilsson, J., Wigzell, H., Christensson, B., Agerberth, B. & Gudmundsson, G. (2001).** Downregulation of bactericidal peptides in enteric infections: a novel immune escape mechanism with bacterial DNA as a potential regulator. *Nat Med* **7**, 180-185.
- Iwai, H., Kim, M., Yoshikawa, Y. & other authors (2007).** A bacterial effector targets Mad2L2, an APC inhibitor, to modulate host cell cycling. *Cell* **130**, 611-623.

- Jayaraman, A. & Wood, T. K. (2008).** Bacterial quorum sensing: signals, circuits, and implications for biofilms and disease. *Annu Rev Biomed Eng* **10**, 145-167.
- Jin, T., Bokarewa, M., Foster, T., Mitchell, J., Higgins, J. & Tarkowski, A. (2004).** *Staphylococcus aureus* resists human defensins by production of staphylokinase, a novel bacterial evasion mechanism. *J Immunol* **172**, 1169-1176.
- Joiner, K. A., Goldman, R. C., Hammer, C. H., Leive, L. & Frank, M. M. (1983).** Studies on the mechanism of bacterial resistance to complement-mediated killing. VI. IgG increases the bactericidal efficiency of C5b-9 for *E. coli* 0111B4 by acting at a step before C5 cleavage. *J Immunol* **131**, 2570-2575.
- Jones, P. A., Samuels, N. M., Phillips, N. J. & other authors (2002).** *Haemophilus influenzae* type b strain A2 has multiple sialyltransferases involved in lipooligosaccharide sialylation. *J Biol Chem* **277**, 14598-14611.
- Jono, H., Xu, H., Kai, H., Lim, D. J., Kim, Y. S., Feng, X. H. & Li, J. D. (2003).** Transforming growth factor-beta-Smad signaling pathway negatively regulates nontypeable *Haemophilus influenzae*-induced MUC5AC mucin transcription via mitogen-activated protein kinase (MAPK) phosphatase-1-dependent inhibition of p38 MAPK. *J Biol Chem* **278**, 27811-27819.
- Jurcisek, J., Greiner, L., Watanabe, H., Zaleski, A., Apicella, M. A. & Bakaletz, L. O. (2005).** Role of sialic acid and complex carbohydrate biosynthesis in biofilm formation by nontypeable *Haemophilus influenzae* in the chinchilla middle ear. *Infect Immun* **73**, 3210-3218.
- Jurcisek, J. A. & Bakaletz, L. O. (2007).** Biofilms formed by nontypeable *Haemophilus influenzae* in vivo contain both double-stranded DNA and type IV pilin protein. *J Bacteriol* **189**, 3868-3875.
- Jurcisek, J. A., Bookwalter, J. E., Baker, B. D., Fernandez, S., Novotny, L. A., Munson, R. S., Jr. & Bakaletz, L. O. (2007).** The PilA protein of non-typeable *Haemophilus influenzae* plays a role in biofilm formation, adherence to epithelial cells and colonization of the mammalian upper respiratory tract. *Mol Microbiol* **65**, 1288-1299.
- Kagan, J. C. & Roy, C. R. (2002).** *Legionella* phagosomes intercept vesicular traffic from endoplasmic reticulum exit sites. *Nat Cell Biol* **4**, 945-954.
- Kawano, Y., Fukata, Y., Oshiro, N., Amano, M., Nakamura, T., Ito, M., Matsumura, F., Inagaki, M. & Kaibuchi, K. (1999).** Phosphorylation of myosin-binding subunit (MBS) of myosin phosphatase by Rho-kinase in vivo. *J Cell Biol* **147**, 1023-1038.
- Kayal, S. & Charbit, A. (2006).** Listeriolysin O: a key protein of *Listeria monocytogenes* with multiple functions. *FEMS Microbiol Rev* **30**, 514-529.
- Ketterer, M. R., Shao, J. Q., Hornick, D. B., Buscher, B., Bandi, V. K. & Apicella, M. A. (1999).** Infection of primary human bronchial epithelial cells by *Haemophilus influenzae*: macropinocytosis as a mechanism of airway epithelial cell entry. *Infect Immun* **67**, 4161-4170.
- Kilian, M. (2005).** Family I. *Pasteurellaceae*. Genus III. *Haemophilus*. In *Bergey's manual of systematic bacteriology*. Garrity, G. M., Staley, J. T., Brenner, D. J. & Krieg, N. R. (ed.) New York: Springer, pp. 883-904.
- Kim, D. & Chung, J. (2002).** Akt: versatile mediator of cell survival and beyond. *J Biochem Mol Biol* **35**, 106-115.
- Kirov, S. M. (2003).** Bacteria that express lateral flagella enable dissection of the multifunctional roles of flagella in pathogenesis. *FEMS Microbiol Lett* **224**, 151-159.

- Kita, H. & Nikaido, H. (1973).** Structure of cell wall lipopolysaccharide from *Salmonella typhimurium*. IV. Anomeric configuration of L-rhamnose residues and its taxonomic implications. *J Bacteriol* **113**, 672-679.
- Knodler, L. A. & Steele-Mortimer, O. (2003).** Taking possession: biogenesis of the *Salmonella*-containing vacuole. *Traffic* **4**, 587-599.
- Knodler, L. A., Vallance, B. A., Hensel, M., Jackel, D., Finlay, B. B. & Steele-Mortimer, O. (2003).** *Salmonella* type III effectors PipB and PipB2 are targeted to detergent-resistant microdomains on internal host cell membranes. *Mol Microbiol* **49**, 685-704.
- Kraiczy, P. & Wurzner, R. (2006).** Complement escape of human pathogenic bacteria by acquisition of complement regulators. *Mol Immunol* **43**, 31-44.
- Krendel, M., Zenke, F. T. & Bokoch, G. M. (2002).** Nucleotide exchange factor GEF-H1 mediates cross-talk between microtubules and the actin cytoskeleton. *Nat Cell Biol* **4**, 294-301.
- Krishnan, N., Robertson, B. D. & Thwaites, G. (2010).** The mechanisms and consequences of the extra-pulmonary dissemination of *Mycobacterium tuberculosis*. *Tuberculosis (Edinb)* **90**, 361-366.
- Kubiet, M., Ramphal, R., Weber, A. & Smith, A. (2000).** Pilus-mediated adherence of *Haemophilus influenzae* to human respiratory mucins. *Infect Immun* **68**, 3362-3367.
- Kumar, H., Kawai, T. & Akira, S. (2009).** Pathogen recognition in the innate immune response. *Biochem J* **420**, 1-16.
- Laarmann, S., Cutter, D., Juehne, T., Barenkamp, S. J. & St Geme, J. W. (2002).** The *Haemophilus influenzae* Hia autotransporter harbours two adhesive pockets that reside in the passenger domain and recognize the same host cell receptor. *Mol Microbiol* **46**, 731-743.
- Le, P. U., Guay, G., Altschuler, Y. & Nabi, I. R. (2002).** Caveolin-1 is a negative regulator of caveolae-mediated endocytosis to the endoplasmic reticulum. *J Biol Chem* **277**, 3371-3379.
- Lee, N. G., Sunshine, M. G., Engstrom, J. J., Gibson, B. W. & Apicella, M. A. (1995).** Mutation of the htrB locus of *Haemophilus influenzae* nontypable strain 2019 is associated with modifications of lipid A and phosphorylation of the lipo-oligosaccharide. *J Biol Chem* **270**, 27151-27159.
- Look, D. C., Chin, C. L., Manzel, L. J. & other authors (2006).** Modulation of airway inflammation by *Haemophilus influenzae* isolates associated with chronic obstructive pulmonary disease exacerbation. *Proc Am Thorac Soc* **3**, 482-483.
- Lukacs, G. L., Rotstein, O. D. & Grinstein, S. (1990).** Phagosomal acidification is mediated by a vacuolar-type H(+)-ATPase in murine macrophages. *J Biol Chem* **265**, 21099-21107.
- Lysenko, E., Richards, J. C., Cox, A. D., Stewart, A., Martin, A., Kapoor, M. & Weiser, J. N. (2000a).** The position of phosphorylcholine on the lipopolysaccharide of *Haemophilus influenzae* affects binding and sensitivity to C-reactive protein-mediated killing. *Mol Microbiol* **35**, 234-245.
- Lysenko, E. S., Gould, J., Bals, R., Wilson, J. M. & Weiser, J. N. (2000b).** Bacterial phosphorylcholine decreases susceptibility to the antimicrobial peptide LL-37/hCAP18 expressed in the upper respiratory tract. *Infect Immun* **68**, 1664-1671.
- Macfadyen, L. P. (2000).** Regulation of competence development in *Haemophilus influenzae*. *J Theor Biol* **207**, 349-359.
- MacNee, W. (2005).** Pathogenesis of chronic obstructive pulmonary disease. *Proc Am Thorac Soc* **2**, 258-266; discussion 290-251.

- Manes, S., del Real, G. & Martinez, A. C. (2003).** Pathogens: raft hijackers. *Nat Rev Immunol* **3**, 557-568.
- Manoil, C. & Beckwith, J. (1985).** TnpA: a transposon probe for protein export signals. *Proc Natl Acad Sci U S A* **82**, 8129-8133.
- Marignani, P. A. & Carpenter, C. L. (2001).** Vav2 is required for cell spreading. *J Cell Biol* **154**, 177-186.
- Marti-Llitas, P., Regueiro, V., Morey, P., Hood, D. W., Saus, C., Sauleda, J., Agusti, A. G., Bengoechea, J. A. & Garmendia, J. (2009).** Nontypeable *Haemophilus influenzae* clearance by alveolar macrophages is impaired by exposure to cigarette smoke. *Infect Immun* **77**, 4232-4242.
- Marti-Llitas, P., Lopez-Gomez, A., Mauro, S. & other authors (2011).** Nontypable *Haemophilus influenzae* displays a prevalent surface structure molecular pattern in clinical isolates. *PLoS One* **6**, e21133.
- Mason, K. M., Munson, R. S., Jr. & Bakaletz, L. O. (2005).** A mutation in the sap operon attenuates survival of nontypeable *Haemophilus influenzae* in a chinchilla model of otitis media. *Infect Immun* **73**, 599-608.
- Mason, K. M., Raffel, F. K., Ray, W. C. & Bakaletz, L. O. (2011).** Heme utilization by nontypeable *Haemophilus influenzae* is essential and dependent on Sap transporter function. *J Bacteriol* **193**, 2527-2535.
- Mason, R. J. (2006).** Biology of alveolar type II cells. *Respiratory* **11 Suppl**: S12-S15
- Masoud, H., Moxon, E. R. & Richards, J. C. (2008).** Structural elucidation of the major Hex4 lipopolysaccharide glycoform from the IgtC mutant of *Haemophilus influenzae* strain Eagan. *Carbohydr Res* **343**, 1424-1434.
- Maughan, H. & Redfield, R. J. (2009).** Tracing the evolution of competence in *Haemophilus influenzae*. *PLoS One* **4**, e5854.
- McCarter, L. & Silverman, M. (1990).** Surface-induced swarmer cell differentiation of *Vibrio parahaemolyticus*. *Mol Microbiol* **4**, 1057-1062.
- McLennan, M. K., Ringoir, D. D., Frirdich, E., Svensson, S. L., Wells, D. H., Jarrell, H., Szymanski, C. M. & Gaynor, E. C. (2008).** *Campylobacter jejuni* biofilms up-regulated in the absence of the stringent response utilize a calcofluor white-reactive polysaccharide. *J Bacteriol* **190**, 1097-1107.
- Meng, G., Spahich, N., Kenjale, R., Waksman, G. & St Geme, J. W., 3rd (2011).** Crystal structure of the *Haemophilus influenzae* Hap adhesin reveals an intercellular oligomerization mechanism for bacterial aggregation. *EMBO J* **30**, 3864-3874.
- Mettlen, M., Pucadyil, T., Ramachandran, R. & Schmid, S. L. (2009).** Dissecting dynamin's role in clathrin-mediated endocytosis. *Biochem Soc Trans* **37**, 1022-1026.
- Meyer, G. & Feldman, E. L. (2002).** Signaling mechanisms that regulate actin-based motility processes in the nervous system. *J Neurochem* **83**, 490-503.
- Mikhail, I., Yildirim, H. H., Lindahl, E. C. & Schweda, E. K. (2005).** Structural characterization of lipid A from nontypeable and type f *Haemophilus influenzae*: variability of fatty acid substitution. *Anal Biochem* **340**, 303-316.
- Miller, A. K., Brannon, M. K., Stevens, L., Johansen, H. K., Selgrade, S. E., Miller, S. I., Hoiby, N. & Moskowitz, S. M. (2011).** PhoQ Mutations Promote Lipid A Modification and

Polymyxin Resistance of *Pseudomonas aeruginosa* Found in Colistin-Treated Cystic Fibrosis Patients. *Antimicrob Agents Chemother* **55**, 5761-5769.

Mimuro, H., Suzuki, T., Nagai, S. & other authors (2007). *Helicobacter pylori* dampens gut epithelial self-renewal by inhibiting apoptosis, a bacterial strategy to enhance colonization of the stomach. *Cell Host Microbe* **2**, 250-263.

Mitra, S. K., Hanson, D. A. & Schlaepfer, D. D. (2005). Focal adhesion kinase: in command and control of cell motility. *Nat Rev Mol Cell Biol* **6**, 56-68.

Miyamoto, N. & Bakaletz, L. O. (1996). Selective adherence of non-typeable *Haemophilus influenzae* (NTHi) to mucus or epithelial cells in the chinchilla eustachian tube and middle ear. *Microb Pathog* **21**, 343-356.

Moon, S. Y. & Zheng, Y. (2003). Rho GTPase-activating proteins in cell regulation. *Trends Cell Biol* **13**, 13-22.

Morey, P., Cano, V., Marti-Llitas, P., Lopez-Gomez, A., Regueiro, V., Saus, C., Bengoechea, J. A. & Garmendia, J. (2011a). Evidence for a non-replicative intracellular stage of nontypable *Haemophilus influenzae* in epithelial cells. *Microbiology* **157**, 234-250.

Moskowitz, S. M., Brannon, M. K., Dasgupta, N. & other authors (2011). PmrB mutations promote polymyxin resistance of *Pseudomonas aeruginosa* isolated from colistin-treated cystic fibrosis patients. *Antimicrob Agents Chemother*.

Moxon, E. R., Sweetman, W. A., Deadman, M. E., Ferguson, D. J. & Hood, D. W. (2008). *Haemophilus influenzae* biofilms: hypothesis or fact? *Trends Microbiol* **16**, 95-100.

Moxon, R., Bayliss, C. & Hood, D. (2006). Bacterial contingency loci: the role of simple sequence DNA repeats in bacterial adaptation. *Annu Rev Genet* **40**, 307-333.

Muenzner, P., Rohde, M., Kneitz, S. & Hauck, C. R. (2005). CEACAM engagement by human pathogens enhances cell adhesion and counteracts bacteria-induced detachment of epithelial cells. *J Cell Biol* **170**, 825-836.

Muenzner, P., Bachmann, V., Zimmermann, W., Hentschel, J. & Hauck, C. R. (2010). Human-restricted bacterial pathogens block shedding of epithelial cells by stimulating integrin activation. *Science* **329**, 1197-1201.

Mukundan, D., Ecevit, Z., Patel, M., Marrs, C. F. & Gilsdorf, J. R. (2007). Pharyngeal colonization dynamics of *Haemophilus influenzae* and *Haemophilus haemolyticus* in healthy adult carriers. *J Clin Microbiol* **45**, 3207-3217.

Mullins, M. A., Register, K. B., Bayles, D. O., Loving, C. L., Nicholson, T. L., Brockmeier, S. L., Dyer, D. W. & Phillips, G. J. (2009). Characterization and comparative analysis of the genes encoding *Haemophilus parasuis* outer membrane proteins P2 and P5. *J Bacteriol* **191**, 5988-6002.

Munson, R. S., Jr., Grass, S. & West, R. (1993). Molecular cloning and sequence of the gene for outer membrane protein P5 of *Haemophilus influenzae*. *Infect Immun* **61**, 4017-4020.

Murphy, T. F., Sethi, S., Klingman, K. L., Brueggemann, A. B. & Doern, G. V. (1999). Simultaneous respiratory tract colonization by multiple strains of nontypeable *Haemophilus influenzae* in chronic obstructive pulmonary disease: implications for antibiotic therapy. *J Infect Dis* **180**, 404-409.

Murphy, T. F. & Kirkham, C. (2002). Biofilm formation by nontypeable *Haemophilus influenzae*: strain variability, outer membrane antigen expression and role of pili. *BMC Microbiol* **2**, 7.

- Murphy, T. F. & Sethi, S. (2002).** Chronic obstructive pulmonary disease: role of bacteria and guide to antibacterial selection in the older patient. *Drugs Aging* **19**, 761-775.
- Murphy, T. F., Brauer, A. L., Schiffmacher, A. T. & Sethi, S. (2004).** Persistent colonization by *Haemophilus influenzae* in chronic obstructive pulmonary disease. *Am J Respir Crit Care Med* **170**, 266-272.
- Murphy, T. F., Brauer, A. L., Eschberger, K., Lobbins, P., Grove, L., Cai, X. & Sethi, S. (2008).** *Pseudomonas aeruginosa* in chronic obstructive pulmonary disease. *Am J Respir Crit Care Med* **177**, 853-860.
- Nagasawa, S. Y., Takuwa, N., Sugimoto, N., Mabuchi, H. & Takuwa, Y. (2005).** Inhibition of Rac activation as a mechanism for negative regulation of actin cytoskeletal reorganization and cell motility by cAMP. *Biochem J* **385**, 737-744.
- Nagele, V., Heesemann, J., Schielke, S., Jimenez-Soto, L. F., Kurzai, O. & Ackermann, N. (2011).** *Neisseria meningitidis* adhesin NadA targets beta1 integrins: functional similarity to Yersinia invasins. *J Biol Chem* **286**, 20536-20546.
- Nakamura, S., Shchepetov, M., Dalia, A. B., Clark, S. E., Murphy, T. F., Sethi, S., Gilsdorf, J. R., Smith, A. L. & Weiser, J. N. (2011).** Molecular basis of increased serum resistance among pulmonary isolates of non-typeable *Haemophilus influenzae*. *PLoS Pathog* **7**, e1001247.
- Nicolas, P. & Mor, A. (1995).** Peptides as weapons against microorganisms in the chemical defense system of vertebrates. *Annu Rev Microbiol* **49**, 277-304.
- Nichols, B. (2003).** Caveosomes and endocytosis of lipid rafts. *J Cell Sci* **116**, 4707-4714.
- O'Connor, K. L. & Mercurio, A. M. (2001).** Protein kinase A regulates Rac and is required for the growth factor-stimulated migration of carcinoma cells. *J Biol Chem* **276**, 47895-47900.
- Oda, T., Kojima, Y., Akaike, T., Ijiri, S., Molla, A. & Maeda, H. (1990).** Inactivation of chemotactic activity of C5a by the serratal 56-kilodalton protease. *Infect Immun* **58**, 1269-1272.
- Ogawa, M., Yoshimori, T., Suzuki, T., Sagara, H., Mizushima, N. & Sasakawa, C. (2005).** Escape of intracellular Shigella from autophagy. *Science* **307**, 727-731.
- Omsland, A. & Heinzen, R. A. (2011).** Life on the outside: the rescue of *Coxiella burnetii* from its host cell. *Annu Rev Microbiol* **65**, 111-128.
- Orihuela, C. J., Mahdavi, J., Thornton, J. & other authors (2009).** Laminin receptor initiates bacterial contact with the blood brain barrier in experimental meningitis models. *J Clin Invest* **119**, 1638-1646.
- Palazzo, A. F., Cook, T. A., Alberts, A. S. & Gundersen, G. G. (2001).** mDia mediates Rho-regulated formation and orientation of stable microtubules. *Nat Cell Biol* **3**, 723-729.
- Pang, B., Winn, D., Johnson, R., Hong, W., West-Barnette, S., Kock, N. & Swords, W. E. (2008).** Lipooligosaccharides containing phosphorylcholine delay pulmonary clearance of nontypeable *Haemophilus influenzae*. *Infect Immun* **76**, 2037-2043.
- Pellicic, V. (2008).** Type IV pili: e pluribus unum? *Mol Microbiol* **68**, 827-837.
- Peschel, A. (2002).** How do bacteria resist human antimicrobial peptides? *Trends Microbiol* **10**, 179-186.
- Philips, J. A. (2008).** Mycobacterial manipulation of vacuolar sorting. *Cell Microbiol* **10**, 2408-2415.

- Pilatz, S., Breitbach, K., Hein, N., Fehlhaber, B., Schulze, J., Brenneke, B., Eberl, L. & Steinmetz, I. (2006). Identification of *Burkholderia pseudomallei* genes required for the intracellular life cycle and in vivo virulence. *Infect Immun* **74**, 3576-3586.
- Pizarro-Cerda, J. & Cossart, P. (2006). Subversion of cellular functions by *Listeria monocytogenes*. *J Pathol* **208**, 215-223.
- Post, J. C. (2001). Direct evidence of bacterial biofilms in otitis media. *Laryngoscope* **111**, 2083-2094.
- Power, P. M., Sweetman, W. A., Gallacher, N. J., Woodhall, M. R., Kumar, G. A., Moxon, E. R. & Hood, D. W. (2009). Simple sequence repeats in *Haemophilus influenzae*. *Infect Genet Evol* **9**, 216-228.
- Poyart, C., Pellegrini, E., Marceau, M., Baptista, M., Jaubert, F., Lamy, M. C. & Trieu-Cuot, P. (2003). Attenuated virulence of *Streptococcus agalactiae* deficient in D-alanyl-lipoteichoic acid is due to an increased susceptibility to defensins and phagocytic cells. *Mol Microbiol* **49**, 1615-1625.
- Prasadaraio, N. V., Lysenko, E., Wass, C. A., Kim, K. S. & Weiser, J. N. (1999). Opacity-associated protein A contributes to the binding of *Haemophilus influenzae* to chag epithelial cells. *Infect Immun* **67**, 4153-4160.
- Rabe, K. F., Hurd, S., Anzueto, A. & other authors (2007). Global strategy for the diagnosis, management, and prevention of chronic obstructive pulmonary disease: GOLD executive summary. *Am J Respir Crit Care Med* **176**, 532-555.
- Raftopoulou, M. & Hall, A. (2004). Cell migration: Rho GTPases lead the way. *Dev Biol* **265**, 23-32.
- Rao, V. K., Krasan, G. P., Hendrixson, D. R., Dawid, S. & St Geme, J. W., 3rd (1999). Molecular determinants of the pathogenesis of disease due to non-typable *Haemophilus influenzae*. *FEMS Microbiol Rev* **23**, 99-129.
- Reddy, M. S., Bernstein, J. M., Murphy, T. F. & Faden, H. S. (1996). Binding between outer membrane proteins of nontypeable *Haemophilus influenzae* and human nasopharyngeal mucin. *Infect Immun* **64**, 1477-1479.
- Regueiro, V., Campos, M. A., Morey, P., Sauleda, J., Agusti, A. G., Garmendia, J. & Bengoechea, J. A. (2009). Lipopolysaccharide-binding protein and CD14 are increased in the bronchoalveolar lavage fluid of smokers. *Eur Respir J* **33**, 273-281.
- Remis, J. P., Costerton, J. W. & Auer, M. (2010). Biofilms: structures that may facilitate cell-cell interactions. *ISME J* **4**, 1085-1087.
- Ridley, A. J., Schwartz, M. A., Burridge, K., Firtel, R. A., Ginsberg, M. H., Borisy, G., Parsons, J. T. & Horwitz, A. R. (2003). Cell migration: integrating signals from front to back. *Science* **302**, 1704-1709.
- Ridley, A. J. (2004). Pulling back to move forward. *Cell* **116**, 357-358.
- Riess, T., Andersson, S. G., Lupas, A. & other authors (2004). *Bartonella* adhesin a mediates a proangiogenic host cell response. *J Exp Med* **200**, 1267-1278.
- Rohatgi, R., Ma, L., Miki, H., Lopez, M., Kirchhausen, T., Takenawa, T. & Kirschner, M. W. (1999). The interaction between N-WASP and the Arp2/3 complex links Cdc42-dependent signals to actin assembly. *Cell* **97**, 221-231.

- Rohatgi, R., Nollau, P., Ho, H. Y., Kirschner, M. W. & Mayer, B. J. (2001).** Nck and phosphatidylinositol 4,5-bisphosphate synergistically activate actin polymerization through the N-WASP-Arp2/3 pathway. *J Biol Chem* **276**, 26448-26452.
- Ronander, E., Brant, M., Janson, H., Sheldon, J., Forsgren, A. & Riesbeck, K. (2008).** Identification of a novel *Haemophilus influenzae* protein important for adhesion to epithelial cells. *Microbes Infect* **10**, 87-96.
- Ronander, E., Brant, M., Eriksson, E., Morgelin, M., Hallgren, O., Westergren-Thorsson, G., Forsgren, A. & Riesbeck, K. (2009).** Nontypeable *Haemophilus influenzae* adhesin protein E: characterization and biological activity. *J Infect Dis* **199**, 522-531.
- Rooijackers, S. H. & van Strijp, J. A. (2007).** Bacterial complement evasion. *Mol Immunol* **44**, 23-32.
- Russell, D. G. (2001).** *Mycobacterium tuberculosis*: here today, and here tomorrow. *Nat Rev Mol Cell Biol* **2**, 569-577.
- Saadat, I., Higashi, H., Obuse, C. & other authors (2007).** *Helicobacter pylori* CagA targets PAR1/MARK kinase to disrupt epithelial cell polarity. *Nature* **447**, 330-333.
- Sambrook, J. & Russell, D. W. (2001).** *Molecular cloning a laboratory manual*. Cold spring Harbor, N.Y: Cold Spring Harbor Laboratory Press.
- Samuelson, A., Freijd, A., Jonasson, J. & Lindberg, A. A. (1995).** Turnover of nonencapsulated *Haemophilus influenzae* in the nasopharynxes of otitis-prone children. *J Clin Microbiol* **33**, 2027-2031.
- Schmidtchen, A., Frick, I. M., Andersson, E., Tapper, H. & Bjorck, L. (2002).** Proteinases of common pathogenic bacteria degrade and inactivate the antibacterial peptide LL-37. *Mol Microbiol* **46**, 157-168.
- Schweda, E. K., Richards, J. C., Hood, D. W. & Moxon, E. R. (2007).** Expression and structural diversity of the lipopolysaccharide of *Haemophilus influenzae*: implication in virulence. *Int J Med Microbiol* **297**, 297-306.
- Serruto, D., Spadafina, T., Scarselli, M. & other authors (2009).** HadA is an atypical new multifunctional trimeric coiled-coil adhesin of *Haemophilus influenzae* biogroup aegyptius, which promotes entry into host cells. *Cell Microbiol* **11**, 1044-1063.
- Sethi, S., Evans, N., Grant, B. J. & Murphy, T. F. (2002).** New strains of bacteria and exacerbations of chronic obstructive pulmonary disease. *N Engl J Med* **347**, 465-471.
- Sethi, S. (2004).** Bacteria in exacerbations of chronic obstructive pulmonary disease: phenomenon or epiphenomenon? *Proc Am Thorac Soc* **1**, 109-114.
- Sethi, S. & Murphy, T. F. (2008).** Infection in the pathogenesis and course of chronic obstructive pulmonary disease. *N Engl J Med* **359**, 2355-2365.
- Severi, E., Randle, G., Kivlin, P., Whitfield, K., Young, R., Moxon, R., Kelly, D., Hood, D. & Thomas, G. H. (2005).** Sialic acid transport in *Haemophilus influenzae* is essential for lipopolysaccharide sialylation and serum resistance and is dependent on a novel tripartite ATP-independent periplasmic transporter. *Mol Microbiol* **58**, 1173-1185.
- Severi, E., Hood, D. W. & Thomas, G. H. (2007).** Sialic acid utilization by bacterial pathogens. *Microbiology* **153**, 2817-2822.
- Severino, V., Chambery, A., Vitiello, M., Cantisani, M., Galdiero, S., Galdiero, M., Malorni, L., Di Maro, A. & Parente, A. (2010).** Proteomic analysis of human U937 cell line activation

mediated by *Haemophilus influenzae* type b P2 porin and its surface-exposed loop 7. *J Proteome Res* **9**, 1050-1062.

Shafer, W. M., Qu, X., Waring, A. J. & Lehrer, R. I. (1998). Modulation of *Neisseria gonorrhoeae* susceptibility to vertebrate antibacterial peptides due to a member of the resistance/nodulation/division efflux pump family. *Proc Natl Acad Sci U S A* **95**, 1829-1833.

Shao, F., Merritt, P. M., Bao, Z., Innes, R. W. & Dixon, J. E. (2002). A *Yersinia* effector and a *Pseudomonas* avirulence protein define a family of cysteine proteases functioning in bacterial pathogenesis. *Cell* **109**, 575-588.

Shelton, C. L., Raffel, F. K., Beatty, W. L., Johnson, S. M. & Mason, K. M. (2011). Sap transporter mediated import and subsequent degradation of antimicrobial peptides in *Haemophilus*. *PLoS Pathog* **7**, e1002360.

Shi, J. & Casanova, J. E. (2006). Invasion of host cells by *Salmonella typhimurium* requires focal adhesion kinase and p130Cas. *Mol Biol Cell* **17**, 4698-4708.

Shuto, T., Xu, H., Wang, B., Han, J., Kai, H., Gu, X. X., Murphy, T. F., Lim, D. J. & Li, J. D. (2001). Activation of NF-kappa B by nontypeable *Haemophilus influenzae* is mediated by toll-like receptor 2-TAK1-dependent NIK-IKK alpha /beta-I kappa B alpha and MKK3/6-p38 MAP kinase signaling pathways in epithelial cells. *Proc Natl Acad Sci U S A* **98**, 8774-8779.

Singh, B., Brant, M., Kilian, M., Hallstrom, B. & Riesbeck, K. (2010). Protein E of *Haemophilus influenzae* is a ubiquitous highly conserved adhesin. *J Infect Dis* **201**, 414-419.

Singh, B., Jalalvand, F., Morgelin, M., Zipfel, P., Blom, A. M. & Riesbeck, K. (2011). *Haemophilus influenzae* protein E recognizes the C-terminal domain of vitronectin and modulates the membrane attack complex. *Mol Microbiol* **81**, 80-98.

Slanina, H., Konig, A., Hebling, S., Hauck, C. R., Frosch, M. & Schubert-Unkmeir, A. (2010). Entry of *Neisseria meningitidis* into mammalian cells requires the Src family protein tyrosine kinases. *Infect Immun* **78**, 1905-1914.

Smith, E. J., Visai, L., Kerrigan, S. W., Speziale, P. & Foster, T. J. (2011). The Sbi protein is a multifunctional immune evasion factor of *Staphylococcus aureus*. *Infect Immun* **79**, 3801-3809.

Smrcka, A. V., Brown, J. H. & Holz, G. G. (2012). Role of phospholipase Cepsilon in physiological phosphoinositide signaling networks. *Cell Signal* **24**, 1333-1343.

Song, J., Bishop, B. L., Li, G., Duncan, M. J. & Abraham, S. N. (2007). TLR4-initiated and cAMP-mediated abrogation of bacterial invasion of the bladder. *Cell Host Microbe* **1**, 287-298.

Sopori, M. (2002). Effects of cigarette smoke on the immune system. *Nat Rev Immunol* **2**, 372-377.

Spahich, N. A., Hood, D. W., Moxon, E. R. & St Geme, J. W., 3rd (2012). Inactivation of *Haemophilus influenzae* lipopolysaccharide biosynthesis genes interferes with outer membrane localization of the hap autotransporter. *J Bacteriol* **194**, 1815-1822.

Srikhanta, Y. N., Maguire, T. L., Stacey, K. J., Grimmond, S. M. & Jennings, M. P. (2005). The phasevarion: a genetic system controlling coordinated, random switching of expression of multiple genes. *Proc Natl Acad Sci U S A* **102**, 5547-5551.

Srikhanta, Y. N., Fox, K. L. & Jennings, M. P. (2010). The phasevarion: phase variation of type III DNA methyltransferases controls coordinated switching in multiple genes. *Nat Rev Microbiol* **8**, 196-206.

- St Geme, J. W., 3rd & Falkow, S. (1990).** *Haemophilus influenzae* adheres to and enters cultured human epithelial cells. *Infect Immun* **58**, 4036-4044.
- St Geme, J. W., 3rd (1993).** Nontypeable *Haemophilus influenzae* disease: epidemiology, pathogenesis, and prospects for prevention. *Infect Agents Dis* **2**, 1-16.
- St Geme, J. W., 3rd (1994).** The HMW1 adhesin of nontypeable *Haemophilus influenzae* recognizes sialylated glycoprotein receptors on cultured human epithelial cells. *Infect Immun* **62**, 3881-3889.
- St Geme, J. W., 3rd, Cutter, D. & Barenkamp, S. J. (1996).** Characterization of the genetic locus encoding *Haemophilus influenzae* type b surface fibrils. *J Bacteriol* **178**, 6281-6287.
- St Geme, J. W., 3rd, Kumar, V. V., Cutter, D. & Barenkamp, S. J. (1998).** Prevalence and distribution of the hmw and hia genes and the HMW and Hia adhesins among genetically diverse strains of nontypeable *Haemophilus influenzae*. *Infect Immun* **66**, 364-368.
- St Geme, J. W., 3rd (2002).** Molecular and cellular determinants of non-typeable *Haemophilus influenzae* adherence and invasion. *Cell Microbiol* **4**, 191-200.
- Starner, T. D., Swords, W. E., Apicella, M. A. & McCray, P. B., Jr. (2002).** Susceptibility of nontypeable *Haemophilus influenzae* to human beta-defensins is influenced by lipooligosaccharide acylation. *Infect Immun* **70**, 5287-5289.
- Stevens, J. M., Galyov, E. E. & Stevens, M. P. (2006).** Actin-dependent movement of bacterial pathogens. *Nat Rev Microbiol* **4**, 91-101.
- Suh, P. G., Park, J. I., Manzoli, L. & other authors (2008).** Multiple roles of phosphoinositide-specific phospholipase C isozymes. *BMB Rep* **41**, 415-434.
- Sulak, O., Cioci, G., Lameignere, E. & other authors (2011).** *Burkholderia cenocepacia* BC2L-C is a super lectin with dual specificity and proinflammatory activity. *PLoS Pathog* **7**, e1002238.
- Sumi, T., Matsumoto, K. & Nakamura, T. (2001).** Specific activation of LIM kinase 2 via phosphorylation of threonine 505 by ROCK, a Rho-dependent protein kinase. *J Biol Chem* **276**, 670-676.
- Swords, W. E., Buscher, B. A., Ver Steeg li, K., Preston, A., Nichols, W. A., Weiser, J. N., Gibson, B. W. & Apicella, M. A. (2000).** Non-typeable *Haemophilus influenzae* adhere to and invade human bronchial epithelial cells via an interaction of lipooligosaccharide with the PAF receptor. *Mol Microbiol* **37**, 13-27.
- Swords, W. E., Ketterer, M. R., Shao, J., Campbell, C. A., Weiser, J. N. & Apicella, M. A. (2001).** Binding of the non-typeable *Haemophilus influenzae* lipooligosaccharide to the PAF receptor initiates host cell signalling. *Cell Microbiol* **3**, 525-536.
- Swords, W. E., Chance, D. L., Cohn, L. A., Shao, J., Apicella, M. A. & Smith, A. L. (2002).** Acylation of the lipooligosaccharide of *Haemophilus influenzae* and colonization: an htrB mutation diminishes the colonization of human airway epithelial cells. *Infect Immun* **70**, 4661-4668.
- Swords, W. E., Moore, M. L., Godzicki, L., Bukofzer, G., Mitten, M. J. & VonCannon, J. (2004).** Sialylation of lipooligosaccharides promotes biofilm formation by nontypeable *Haemophilus influenzae*. *Infect Immun* **72**, 106-113.
- Taganna, J., de Boer, A. R., Wuhrer, M. & Bouckaert, J. (2011).** Glycosylation changes as important factors for the susceptibility to urinary tract infection. *Biochem Soc Trans* **39**, 349-354.

- Takesono, A., Heasman, S. J., Wojciak-Stothard, B., Garg, R. & Ridley, A. J. (2010).** Microtubules regulate migratory polarity through Rho/ROCK signaling in T cells. *PLoS One* **5**, e8774.
- Taylor, J. D. (2010).** COPD and the response of the lung to tobacco smoke exposure. *Pulm Pharmacol Ther* **23**, 376-383.
- Thanassi, D. G., Bliska, J. B. & Christie, P. J. (2012).** Surface organelles assembled by secretion systems of Gram-negative bacteria: diversity in structure and function. *FEMS Microbiol Rev*.
- Tilney, L. G., Harb, O. S., Connelly, P. S., Robinson, C. G. & Roy, C. R. (2001).** How the parasitic bacterium *Legionella pneumophila* modifies its phagosome and transforms it into rough ER: implications for conversion of plasma membrane to the ER membrane. *J Cell Sci* **114**, 4637-4650.
- tlaskalova-Hogenova, H., Stepankova, R., Hudcovic, T. & other authors (2004).** Commensal bacteria (normal microflora), mucosal immunity and chronic inflammatory and autoimmune diseases. *Immunol Lett* **93**, 97-108.
- Toleman, M., Aho, E. & Virji, M. (2001).** Expression of pathogen-like Opa adhesins in commensal *Neisseria*: genetic and functional analysis. *Cell Microbiol* **3**, 33-44.
- Tsuda, K., Amano, A., Umebayashi, K., Inaba, H., Nakagawa, I., Nakanishi, Y. & Yoshimori, T. (2005).** Molecular dissection of internalization of *Porphyromonas gingivalis* by cells using fluorescent beads coated with bacterial membrane vesicle. *Cell Struct Funct* **30**, 81-91.
- Twelkmeyer, B., Deadman, M. E., Haque, E., Li, J., Hood, D. W. & Schweda, E. K. (2011).** The role of lic2B in lipopolysaccharide biosynthesis in *Haemophilus influenzae* strain Eagan. *Carbohydr Res* **346**, 1262-1266.
- Uliczka, F., Kornprobst, T., Eitel, J., Schneider, D. & Dersch, P. (2009).** Cell invasion of *Yersinia pseudotuberculosis* by invasin and YadA requires protein kinase C, phospholipase C-gamma1 and Akt kinase. *Cell Microbiol* **11**, 1782-1801.
- Vaara, M. (1992).** Agents that increase the permeability of the outer membrane. *Microbiol Rev* **56**, 395-411.
- Valdez, Y., Ferreira, R. B. & Finlay, B. B. (2009).** Molecular mechanisms of *Salmonella* virulence and host resistance. *Curr Top Microbiol Immunol* **337**, 93-127.
- Van den Broeke, C., Radu, M., Chernoff, J. & Favoreel, H. W. (2010).** An emerging role for p21-activated kinases (Paks) in viral infections. *Trends Cell Biol* **20**, 160-169.
- Vancheri, C., Mastruzzo, C., Sortino, M. A. & Crimi, N. (2004).** The lung as a privileged site for the beneficial actions of PGE2. *Trends Immunol* **25**, 40-46.
- Veiga, E. & Cossart, P. (2005).** Listeria hijacks the clathrin-dependent endocytic machinery to invade mammalian cells. *Nat Cell Biol* **7**, 894-900.
- Veiga, E., Guttman, J. A., Bonazzi, M. & other authors (2007).** Invasive and adherent bacterial pathogens co-opt host clathrin for infection. *Cell Host Microbe* **2**, 340-351.
- Vieira, O. V., Botelho, R. J. & Grinstein, S. (2002).** Phagosome maturation: aging gracefully. *Biochem J* **366**, 689-704.
- Virji, M., Kayhty, H., Ferguson, D. J., Alexandrescu, C. & Moxon, E. R. (1991).** Interactions of *Haemophilus influenzae* with cultured human endothelial cells. *Microb Pathog* **10**, 231-245.

- Virji, M., Makepeace, K., Ferguson, D. J. & Watt, S. M. (1996).** Carcinoembryonic antigens (CD66) on epithelial cells and neutrophils are receptors for Opa proteins of pathogenic neisseriae. *Mol Microbiol* **22**, 941-950.
- Virji, M., Evans, D., Griffith, J., Hill, D., Serino, L., Hadfield, A. & Watt, S. M. (2000).** Carcinoembryonic antigens are targeted by diverse strains of typable and non-typable *Haemophilus influenzae*. *Mol Microbiol* **36**, 784-795.
- Vivoda, M., Cirkovic, I., Aleksic, D., Ranin, L. & Dukic, S. (2011).** [Biology and intracellular life of chlamydia]. *Med Pregl* **64**, 561-564.
- Wang, B., Cleary, P. P., Xu, H. & Li, J. D. (2003).** Up-regulation of interleukin-8 by novel small cytoplasmic molecules of nontypeable *Haemophilus influenzae* via p38 and extracellular signal-regulated kinase pathways. *Infect Immun* **71**, 5523-5530.
- Wang, X., Moser, C., Louboutin, J. P., Lysenko, E. S., Weiner, D. J., Weiser, J. N. & Wilson, J. M. (2002).** Toll-like receptor 4 mediates innate immune responses to *Haemophilus influenzae* infection in mouse lung. *J Immunol* **168**, 810-815.
- Waschke, J., Drenckhahn, D., Adamson, R. H., Barth, H. & Curry, F. E. (2004).** cAMP protects endothelial barrier functions by preventing Rac-1 inhibition. *Am J Physiol Heart Circ Physiol* **287**, H2427-2433.
- Watabe-Uchida, M., John, K. A., Janas, J. A., Newey, S. E. & Van Aelst, L. (2006).** The Rac activator DOCK7 regulates neuronal polarity through local phosphorylation of stathmin/Op18. *Neuron* **51**, 727-739.
- Watarai, M., Funato, S. & Sasakawa, C. (1996).** Interaction of Ipa proteins of *Shigella flexneri* with alpha5beta1 integrin promotes entry of the bacteria into mammalian cells. *J Exp Med* **183**, 991-999.
- Watarai, M., Makino, S., Michikawa, M., Yanagisawa, K., Murakami, S. & Shirahata, T. (2002).** Macrophage plasma membrane cholesterol contributes to *Brucella abortus* infection of mice. *Infect Immun* **70**, 4818-4825.
- Watson, M. E., Jr., Burns, J. L. & Smith, A. L. (2004).** Hypermutable *Haemophilus influenzae* with mutations in mutS are found in cystic fibrosis sputum. *Microbiology* **150**, 2947-2958.
- Webb, D. C. & Cripps, A. W. (1998).** Secondary structure and molecular analysis of interstrain variability in the P5 outer-membrane protein of non-typable *Haemophilus influenzae* isolated from diverse anatomical sites. *J Med Microbiol* **47**, 1059-1067.
- Webster, P., Wu, S., Gomez, G., Apicella, M., Plaut, A. G. & St Geme, J. W., 3rd (2006).** Distribution of bacterial proteins in biofilms formed by non-typeable *Haemophilus influenzae*. *J Histochem Cytochem* **54**, 829-842.
- Weernink, P. A., Meletiadiis, K., Hommeltenberg, S., Hinz, M., Ishihara, H., Schmidt, M. & Jakobs, K. H. (2004).** Activation of type I phosphatidylinositol 4-phosphate 5-kinase isoforms by the Rho GTPases, RhoA, Rac1, and Cdc42. *J Biol Chem* **279**, 7840-7849.
- Weiser, J. N., Chong, S. T., Greenberg, D. & Fong, W. (1995).** Identification and characterization of a cell envelope protein of *Haemophilus influenzae* contributing to phase variation in colony opacity and nasopharyngeal colonization. *Mol Microbiol* **17**, 555-564.
- Weiser, J. N., Shchepetov, M. & Chong, S. T. (1997).** Decoration of lipopolysaccharide with phosphorylcholine: a phase-variable characteristic of *Haemophilus influenzae*. *Infect Immun* **65**, 943-950.
- Weiser, J. N. & Pan, N. (1998).** Adaptation of *Haemophilus influenzae* to acquired and innate humoral immunity based on phase variation of lipopolysaccharide. *Mol Microbiol* **30**, 767-775.

- Weiser, J. N., Pan, N., McGowan, K. L., Musher, D., Martin, A. & Richards, J. (1998).** Phosphorylcholine on the lipopolysaccharide of *Haemophilus influenzae* contributes to persistence in the respiratory tract and sensitivity to serum killing mediated by C-reactive protein. *J Exp Med* **187**, 631-640.
- White, K. A., Kaltashov, I. A., Cotter, R. J. & Raetz, C. R. (1997).** A mono-functional 3-deoxy-D-manno-octulosonic acid (Kdo) transferase and a Kdo kinase in extracts of *Haemophilus influenzae*. *J Biol Chem* **272**, 16555-16563.
- Whitworth, T., Popov, V. L., Yu, X. J., Walker, D. H. & Bouyer, D. H. (2005).** Expression of the Rickettsia prowazekii pld or tlyC gene in *Salmonella enterica* serovar Typhimurium mediates phagosomal escape. *Infect Immun* **73**, 6668-6673.
- Wong, A. R., Raymond, B., Collins, J. W., Crepin, V. F. & Frankel, G. (2012).** The enteropathogenic E. coli effector EspH promotes actin pedestal formation and elongation via WASP-interacting protein (WIP). *Cell Microbiol* **14**, 1051-1070.
- Wong, K. W. & Isberg, R. R. (2003).** Arf6 and phosphoinositol-4-phosphate-5-kinase activities permit bypass of the Rac1 requirement for beta1 integrin-mediated bacterial uptake. *J Exp Med* **198**, 603-614.
- Wong, S. M., St Michael, F., Cox, A., Ram, S. & Akerley, B. J. (2011).** ArcA-regulated glycosyltransferase lic2B promotes complement evasion and pathogenesis of nontypeable *Haemophilus influenzae*. *Infect Immun* **79**, 1971-1983.
- Wooldridge, K. G., Williams, P. H. & Ketley, J. M. (1996).** Host signal transduction and endocytosis of *Campylobacter jejuni*. *Microb Pathog* **21**, 299-305.
- Wu, J., Weening, E. H., Faske, J. B., Hook, M. & Skare, J. T. (2011).** Invasion of eukaryotic cells by *Borrelia burgdorferi* requires beta(1) integrins and Src kinase activity. *Infect Immun* **79**, 1338-1348.
- Xiao, Y., Zhong, Y., Greene, W., Dong, F. & Zhong, G. (2004).** *Chlamydia trachomatis* infection inhibits both Bax and Bak activation induced by staurosporine. *Infect Immun* **72**, 5470-5474.
- Xu, Q., Kaur, R., Casey, J. R., Adlowitz, D. G., Pichichero, M. E. & Zeng, M. (2011).** Identification of *Streptococcus pneumoniae* and *Haemophilus influenzae* in culture-negative middle ear fluids from children with acute otitis media by combination of multiplex PCR and multi-locus sequencing typing. *Int J Pediatr Otorhinolaryngol* **75**, 239-244.
- Yoshida, K., Inoue, N., Sonobe, S. & Shimmen, T. (2003).** Involvement of microtubules in rhizoid differentiation of *Spirogyra* species. *Protoplasma* **221**, 227-235.
- Yoshikawa, Y., Ogawa, M., Hain, T. & other authors (2009).** *Listeria monocytogenes* ActA-mediated escape from autophagic recognition. *Nat Cell Biol* **11**, 1233-1240.
- Young, A. (2007).** Structural insights into the clathrin coat. *Semin Cell Dev Biol* **18**, 448-458.
- Zaas, D. W., Duncan, M., Rae Wright, J. & Abraham, S. N. (2005).** The role of lipid rafts in the pathogenesis of bacterial infections. *Biochim Biophys Acta* **1746**, 305-313.
- Zamir, E. & Geiger, B. (2001).** Components of cell-matrix adhesions. *J Cell Sci* **114**, 3577-3579.

ANEXOS

ANEXO I: CEPAS, CEBADORES, PLÁSMIDOS, INHIBIDORES FARMACOLÓGICOS, dsRNA Y ANTICUERPOS EMPLEADOS EN ESTE TRABAJO

Tabla 1. Cepas utilizadas en este trabajo

Cepa	Características relevantes	Referencia
HiNT375	Aislado clínico de otitis media. Cepa silvestre que expresa un nivel intermedio de PCho en la molécula de LOS	(Bouchet <i>et al.</i> , 2003)
Hi Rd KW20	Cepa carente de cápsula, generada a partir de una cepa de <i>H. influenzae</i> serotipo d. Cepa no patógena	(Fleischmann <i>et al.</i> , 1995)
HiNT375 Δ <i>lic1BC</i>	Mutante de HiNT375 en el que los genes <i>lic1B</i> y <i>lic1C</i> han sido sustituidos mediante doble recombinación homóloga por un fragmento de ADN de 3.3 kb que contiene una disrupción de <i>lic1BC</i> con un gen de resistencia a eritromicina	Dr. Pau Morey
HiNT375 Δ <i>siaB</i>	Mutante de HiNT375 en el que el gen <i>siaB</i> ha sido sustituido mediante doble recombinación homóloga por un fragmento de ADN de 3.6 kb que contiene una disrupción de <i>siaB</i> con un gen de resistencia a eritromicina	Dr. Pau Morey
HiNT375 Δ <i>lic2A</i>	Mutante de HiNT375 en el que el gen <i>lic2A</i> ha sido sustituido mediante doble recombinación homóloga por un fragmento de ADN de 3.6 kb que contiene una disrupción de <i>lic2A</i> con un gen de resistencia a eritromicina	Dr. Pau Morey
HiNT375 Δ <i>lgtF</i>	Mutante de HiNT375 en el que el gen <i>lgtF</i> ha sido sustituido mediante doble recombinación homóloga por un fragmento de ADN de 3.6 kb que contiene una disrupción de <i>lgtF</i> con un gen de resistencia a eritromicina	Dr. Pau Morey
HiNT375 Δ <i>lpsA</i>	Mutante de HiNT375 en el que el gen <i>lpsA</i> ha sido sustituido mediante doble recombinación homóloga por un fragmento de ADN de 3.6 kb que contiene una disrupción de <i>lpsA</i> con un gen de resistencia a eritromicina	Dr. Pau Morey
HiNT375 Δ <i>opsX</i>	Mutante de HiNT375 en el que el gen <i>opsX</i> ha sido sustituido mediante doble recombinación homóloga por un fragmento de ADN de 3.6 kb que contiene una disrupción de <i>opsX</i> con un gen de resistencia a eritromicina	Dr. Pau Morey
HiNT375 Δ <i>lgtF</i> Δ <i>lpsA</i>	Mutante de HiNT375 Δ <i>lgtF</i> en el que el gen <i>lpsA</i> ha sido sustituido mediante doble recombinación homóloga por un fragmento de ADN de 3.6 kb que contiene una disrupción de <i>lpsA</i> con un gen de resistencia a kanamicina	Dr. Pau Morey
HiNT375 Δ <i>lgtF</i> -c	Complementación cromosómica de la cepa mutante HiNT375 Δ <i>lgtF</i> . El pseudogen HI0601.1 ha sido sustituido mediante doble recombinación homóloga por un fragmento de ADN de 4.8 kb que contiene una disrupción de HI0601.1 con el gen <i>lgtF</i> expresado bajo el control de su propio promotor y un gen de resistencia a kanamicina	Dr. Pau Morey
HiNT375 Δ <i>lic1BC</i> -c	Complementación cromosómica de la cepa HiNT375 Δ <i>lic1BC</i> . El pseudogen HI0601.1 ha sido	Dr. Pau Morey

	sustituido mediante doble recombinación homóloga por un fragmento de ADN de 4.5 kb que contiene una disrupción de HI0601.1 con el gen <i>lic1BC</i> expresado bajo el control de su propio promotor y un gen de resistencia a kanamicina	
HiNT375 Δ <i>lic2A</i> -c	Complementación cromosómica de la cepa HiNT375 Δ <i>lic2A</i> . El pseudogen HI0601.1 ha sido sustituido mediante doble recombinación homóloga por un fragmento de ADN de 4.8 kb que contiene una disrupción de HI0601.1 con el gen <i>lic2A</i> expresado bajo el control de su propio promotor y un gen de resistencia a kanamicina	Dr. Pau Morey
HiNT375 Δ <i>sapA</i>	Mutante de HiNT375 en el que el gen <i>sapA</i> ha sido sustituido mediante doble recombinación homóloga por un fragmento de ADN de 3.6 kb que contiene una disrupción de <i>sapA</i> con un gen de resistencia a eritromicina	Pau Martí-Lliteras
HiNT375 Δ <i>ompP5</i>	Mutante de HiNT375 en el que el gen <i>ompP5</i> ha sido sustituido mediante doble recombinación homóloga por un fragmento de ADN de 3.2 kb que contiene una disrupción de <i>ompP5</i> con un gen de resistencia a eritromicina	Este trabajo
HiNT375 Δ <i>hap</i>	Mutante de HiNT375 en el que el gen <i>hap</i> ha sido sustituido mediante doble recombinación homóloga por un fragmento de ADN de 3.3 kb que contiene una disrupción de <i>hap</i> con un gen de resistencia a eritromicina	Este trabajo
HiNT375 Δ <i>hap</i> Δ <i>ompP5</i>	Mutante de HiNT375 Δ <i>hap</i> en el que el gen <i>ompP5</i> ha sido sustituido mediante doble recombinación homóloga por un fragmento de ADN de 3.2 kb que contiene una disrupción de <i>ompP5</i> con un gen de resistencia a kanamicina	Este trabajo
HiNT375 Δ <i>hap</i> Δ <i>lic1BC</i>	Mutante de HiNT375 Δ <i>hap</i> en el que el gen <i>lic1BC</i> ha sido sustituido mediante doble recombinación homóloga por un fragmento de ADN de 3.3 kb que contiene una disrupción de <i>lic1BC</i> con un gen de resistencia a kanamicina	Este trabajo
<i>E. coli</i> CC118 λ pir	Δ (<i>ara-leu</i>), <i>araD</i> , Δ <i>lacX74</i> , <i>galK</i> , <i>phoA20</i> , <i>thi-1</i> , <i>rpsE</i> , <i>rpoB</i> , <i>argE</i> (Am), <i>recA1</i> , <i>λpir</i> phage lysogen	(Manoil & Beckwith, 1985)

Tabla 2. Cebadores utilizados en este trabajo

Nombre	Secuencia (5'-3')
lic1BC-F1	GAAACCTATTGCAATCAGACAAATAAA
lic1BC-R1	AACTCTATTTTCACCTGAAAATCTGAC
lic1BC-F2	AGCAGCAGGATTAGGCAGCCGATTTA
lic1BC-R2	GAAACCTATTGCAATCAGACAAATAAA
hap-F1	TAAAGCCGGAAGTGCGGTGGTTTCTGG
hap-R1	TTACCAACGATACCCCAATTTACGCCCCAC
hap-F2	AGCAGAAAACGAACTTGCGTCAAATTGGGG
hap-R2	GAATCATAGCGTCTTTTATCCTGTGCGATA
ompP5-F1	AGCCAGACTTAATCTATCCGAATAATTTGT
ompP5-R1	TTGCGGGTTTTATTTTCCACTGTGATTAA
ompP5-F2	ACCAATGGCTAACTCGCGTAGGTAAATACC
ompP5-R2	CTGCGTATTCTGCACCTACTGCAAATAAAC
P5-Fw	CTGCAATCGCATTAGTAGTTGCTGGTTTAG
P5-Rv	AGTACCGTTTACCGCGATTTCTACACGACG

Tabla 3. Plásmidos usados en este trabajo.

Plásmido	Descripción	Referencia
pUC4K	Ap ^r , Km ^r . Derivado del plásmido pUC4 que contiene un casete de resistencia a Kanamicina Gene Block (GB). Origen de replicación ColE1.	GE Healthcare
pBSLerm	Erm ^r . Contiene un gen de resistencia a eritromicina <i>ermC</i> .	(Swords <i>et al.</i> , 2000)
pGEM-T Easy	Ap ^r . Plásmido para clonar fragmentos de ADN obtenidos mediante PCR con polimerasa <i>Taq</i> . Origen de replicación f1.	Promega
pGEM-T/ <i>lic1BC</i>	Ap ^r . Derivado de pGEM-T Easy en el que se clonó un producto de PCR que contiene los genes <i>lic1BC</i> , amplificado con polimerasa <i>Taq</i> a partir de ADN genómico de HiNT375.	Este trabajo
pGEM-T/ <i>hap</i>	Ap ^r . Derivado de pGEM-T Easy en el que se clonó un producto de PCR que contiene el gen <i>hap</i> , amplificado con polimerasa <i>Taq</i> a partir de ADN genómico de HiNT375.	Este trabajo
pGEM-T/ <i>ompP5</i>	Ap ^r . Derivado de pGEM-T Easy en el que se clonó un producto de PCR que contiene el gen <i>ompP5</i> amplificado mediante PCR con polimerasa <i>Taq</i> a partir de ADN genómico de HiNT375.	Este trabajo
pAL-1	Erm ^r , Ap ^r . Derivado de pGEM-T/ <i>lic1BC</i> en el que se clonó el gen de resistencia <i>ermC</i> obtenido mediante digestión <i>SmaI</i> a partir de pBSLerm, generando un casete de disrupción de los genes <i>lic1BC</i> .	Este trabajo
pAL-2	Erm ^r , Ap ^r . Derivado de pGEM-T/ <i>hap</i> en el que se clonó el gen de resistencia <i>ermC</i> obtenido mediante digestión <i>SmaI</i> a partir de pBSLerm, generando un casete de disrupción del gen <i>hap</i> .	Este trabajo
pAL-3	Erm ^r , Ap ^r . Derivado de pGEM-T/ <i>ompP5</i> en el que se clonó el gen de resistencia <i>ermC</i> obtenido mediante digestión <i>SmaI</i> a partir de pBSLerm, generando un casete de disrupción del gen <i>ompP5</i> .	Este trabajo
pAL-4	Km ^r , Ap ^r . Derivado de pGEM-T/ <i>ompP5</i> en el que se clonó el gen de resistencia <i>km^r</i> obtenido mediante digestión <i>HincII</i> a partir de pUC4K, generando un casete de disrupción del gen <i>ompP5</i> .	Este trabajo
pAL-5	Km ^r , Ap ^r . Derivado de pGEM-T/ <i>lic1BC</i> en el que se clonó el gen de resistencia <i>Km^r</i> obtenido mediante digestión <i>HincII</i> a partir de PUC4K, generando un casete de disrupción de los genes <i>lic1BC</i> .	Este trabajo
pSrcK297M	Plásmido de transfección que expresa una forma inactiva (mutante SrcK297M) de la quinasa Src.	(Agarwal <i>et al.</i> , 2010)
pSrc-GFP	Plásmido de transfección que expresa la fusión traduccional Src-GFP.	Proporcionado por Dr. Pau Morey

Tabla 4. Descripción de agentes farmacológicos utilizados en este trabajo.

Agente farmacológico/ Referencia	Solvente/ Concentración stock	Concentración de trabajo	Tiempo pre- exposición celular	Actividad
Genisteína/G6649 (Sigma)	DMSO/36 mM	75 µM	30'	Inhibidor de tirosina quinasas
Y27632/688000 (Calbiochem)	H ₂ O/10 mM	10 µM	30'	Inhibidor de ROCK
PP2/PHZ1223 (GIBCO)	DMSO/3.31 mM	40 µM	1h	Inhibidor tirosina quinasas de la familia Src
Akt VIII/ 124118 (Calbiochem)	DMSO/1.81 mM	10 µM	1h	Inhibidor de Akt1/Akt2
PP3/PN53758 (GIBCO)	H ₂ O/4.73 mM	10 µM	1h	Análogo estructural no funcional de PP2
PF-573228/PZ0117 (Sigma)	DMSO/10.17 mM	10 µM	1h	Inhibidor de FAK
H-89/B1427 (Sigma)	H ₂ O/9.63 mM	10 µM	1h	Inhibidor de PKA
Forskolin/F3917 (Sigma)	DMSO/10 mM	10 µM	20'	Activador de adenilato ciclasas
PGE ₂ /P0409 (Sigma)	Etanol/2.82 mM	2 µM	1h	Activador de adenilato ciclasas
Dynasore/D7693 (Sigma)	DMSO/15.51 mM	40 µM	1h	Inhibidor de la actividad GTPasa de las dinaminas 1 y 2
MβCD/C4555 (Sigma)	H ₂ O/50 mM	5 µM	1h	Deplector de colesterol
U-73122/U6756 (Sigma)	DMSO/10.76 mM	10 µM	1h	Inhibidor de PLC
Gö6983/G1918 (Sigma)	DMSO/1.13 mM	5 µM	1h	Inhibidor de PKC
Calphostin C/C6303 (Sigma)	DMSO/1.26 mM	1 µM	1h	Inhibidor de PKC
GF109203X/B6292 (SIGMA)	DMSO/0.56 mM	5 µM	1h	Inhibidor de PKC
Tunicamicina/93755 (Sigma)	DMSO/1 mg/ml	2 µg/ml	16h	Inhibidor de N-glicosilación de proteínas
Toxina B (<i>Clostridium difficile</i>)/ 616377 (Calbiochem)	H ₂ O/40 µg/ml	100ng/ml	2h	Inhibidor de GTPasas Rac1, RhoA y Cdc42
CT04/PN30263 (Invitrogen)	H ₂ O/10 mM	10 µM	30'	Inhibidor de GTPasa RhoA
NSC23766/553502 (Calbiochem)	H ₂ O/10 mM	100 µM	16h	Inhibidor de GTPasa Rac1
Concanavalina A/C11252 (Molecular probes)	NaHCO ₃ /50 mg/ml	15 µg/ml	3h	Lectina que se une específicamente a los residuos manosa
Colchicina/C9754 (Sigma)	DMSO/10 mM	30 µM	1h	Inhibidor de polimerización de microtúbulos

Tabla 5. dsRNAi empleados en este trabajo.

Nombre	Secuencia (5'-3')	Referencia	Distribuidor
SMART pool Vav2	CUGAAAGUCUGCCACGAUA; UGGCAGCUGUCUUCUUA; GUGGGAGGGUCGUCUGGUA; GCCGCUGGCUCAUCGAUUG	ON-TARGET plus SMART pool siRNA L- 005199-00- 0005	Thermo Scientific
SMART pool clathrin heavy chain	CGUAAGAAGGCUCGAGAGU; GCAGAAGAAUCAACGUUAU; UGAGAAAUGUAAUGCGAAU; GAGAAUGGCUGUACGUAAU	ON-TARGET plus SMART pool L-004001- 01-0005	Thermo Scientific
Op18/estatmina	Hs_STMN1_1 AAGCTGAGGTCTTGAAGCAGC Hs_STMN1_13 AAGAAATTAGAAGCTGCAGAA	SI00301875 SI05391379	QIAGEN
SMART pool RhoA	GGAUUGAUGAGCACACAAG; GCAGAGAUUAGGCAAACAG; GACCAAAGAUGGAGUGAGA; CGACAGCCCUGAUAGUUUA	ON-TARGET plus SMART pool L- 003860-00- 0005	Thermo Scientific
SMART pool Rac1	GAACUGCUAUUUCUCUAA; AUGAAAGUGUCACGGGUA; GUAGUUCUCAGAUGCGUA; GUGAUUUCAUAGCGAGUUU	ON-TARGET plus SMART pool L-003560- 00-0005	Thermo Scientific
Caveolina	Hs_CAV_10 AAGCAAGTGTACGACGCGCAC Hs_CAV_13 AAATTAAGAGCTTCCTGATTG	SI00299642 SI02654617	QIAGEN
FAK	Hs_PTK2_5 CACCTGGGTACTGGTATGGAA Hs_PTK2_10 CCGGTCGAATGATAAGGTGTA	SI00287791 SI02622130	QIAGEN
PAK	Hs_PAK1_6 AACCCAAACATTGTGAATTAC Hs_PAK1_7 AAGAGAAAGAGCGGCCAGAGA	SI00301056 SI00301063	QIAGEN
AllStars (Control negativo dsRNAi)	UUCUUCGAACGUGUCACG	Ref. 1027310	QIAGEN
Integrina $\beta 1$	No disponible	Sc-35674	Santa Cruz Biotechnoly, INC

Tabla 10. Descripción de los anticuerpos utilizados en este trabajo.

Anticuerpo primario (referencia)	Tipo membrana	Bloqueo: Tiempo; Tampón; T°	Incubación con anticuerpo primario: Tiempo; Tampón; T°	Nº células depositadas/ nº células aprox. en momento de infección	Dilución anticuerpo 1°	Dilución anticuerpo 2°
Conejo anti-Src [pY ⁴¹⁸] (Invitrogen 44660G)	PVDF	o/n; TBS; 4°C	4 h; TBS; 4°C	1.2 X10 ⁵ cels/ml- 4.8 X10 ⁵ cels/ml	1:20000	1:20000
Conejo anti-Src [pY ⁵²⁹] (Invitrogen 44662G)	PVDF	o/n; TBS; 4°C	4 h; TBS; 4°C	1.2 X10 ⁵ cels/ml- 4.8 X10 ⁵ cels/ml	1:20000	1:20000
Ratón anti-Phosphotyrosine (clon 4G10 Millipore 05-321X)	PVDF	o/n; TBS; 4°C	4 h; TBS; 4°C	1.2 X10 ⁵ cels/ml- 4.8 X10 ⁵ cels/ml	1:10000	1:1000
Conejo anti-FAK (Cell signaling #3285)	Nitrocelulosa	o/n; TBS; 4°C	4 h; TBS; 4°C	6 x10 ⁴ cels/ml- 2.4X10 ⁵ cels/ml	1:20000	1:20000
Conejo anti-Akt (Cell signaling #9272)	Nitrocelulosa	o/n; TBS; 4°C	4 h; TBS; 4°C	4x10 ⁴ cels/ml- 1.6X10 ⁵ cels/ml	1:1000	1:1000
Conejo anti-Phospho-Akt [pS ⁴⁷³] (Cell signaling #9271)	Nitrocelulosa	o/n; TBS; 4°C	4 h; TBS; 4°C	4x10 ⁴ cels/ml- 1.6X10 ⁵ cels/ml	1:1000	1:1000
Conejo anti-PAK (Cell signaling #2602)	Nitrocelulosa	o/n; TBS; 4°C	4 h; TBS; 4°C	6 x10 ⁴ cels/ml- 2.4X10 ⁵ cels/ml	1:5000	1:5000
Conejo anti-cadena pesada clatrina (abcam ab21679)	Nitrocelulosa	o/n; TBS; 4°C	4 h; TBS; 4°C	6 x10 ⁴ cels/ml- 2.4X10 ⁵ cels/ml	1:2500	1:5000
Conejo anti-c-Src (SRC2) (Santa Cruz Biotechnology, INC)	Nitrocelulosa	o/n; TBS; 4°C	4 h; TBS; 4°C	6 x10 ⁴ cels/ml- 2.4X10 ⁵ cels/ml	1:20000	1:20000
Ratón anti-Rac1 (clon 23A8 Millipore #05-389)	Nitrocelulosa	o/n; TBS; 4°C	4 h; TBS; 4°C	6 x10 ⁴ cels/ml- 2.4X10 ⁵ cels/ml	1:1000	1:1000
Ratón anti-RhoA (26C4: sc-418 Santa Cruz Biotechnology, INC)	Nitrocelulosa	o/n; TBS; 4°C	4 h; TBS; 4°C	6 x10 ⁴ cels/ml- 2.4X10 ⁵ cels/ml	1:500	1:1000
Conejo anti-estatmina (Calbiochem 569391)	Nitrocelulosa	o/n; TBS; 4°C	4 h; TBS; 4°C	6 x10 ⁴ cels/ml- 2.4X10 ⁵ cels/ml	1:10000	1:4000
Ratón anti-α-Tubulina (Sigma- ALDRICH T5168)	Nitrocelulosa	o/n; TBS; 4°C	4 h; TBS; 4°C	6 x10 ⁴ cels/ml- 2.4X10 ⁵ cels/ml	1:3000	1:1000
Ratón anti-GFP (ClonTech 632381)	Nitrocelulosa	o/n; TBS; 4°C	4 h; TBS; 4°C	6 x10 ⁴ cels/ml- 2.4X10 ⁵ cels/ml	1:8000	1:1000

Anexo

Conejo anti-Vav2 (Cell Signaling C64H2)	Nitrocelulosa	o/n; TBS; 4°C	4 h; TBS; 4°C	6 x10 ⁴ cels/ml- 2.4X10 ⁵ cels/ml	1:2500	1:2500
Cabra anti-integrina β1 (sc-6622, Santa Cruz Biotechnology, INC)	Nitrocelulosa	o/n; TBS; 4°C	4 h; TBS; 4°C	6 x10 ⁴ cels/ml- 2.4X10 ⁵ cels/ml	1:1000	1:5000
Ratón anti-CEACAM1 (MAB2244, R&D Systems)	Nitrocelulosa	o/n; TBS; 4°C	4 h; TBS; 4°C	6 x10 ⁴ cels/ml- 2.4X10 ⁵ cels/ml	1.500	1:1000

Tabla 7. Características de la colección de 20 sets de cepas de HiNT aisladas de 20 pacientes respiratorios crónicos (1 set por paciente) durante diferentes visitas médicas como consecuencia de una agudización de la enfermedad crónica subyacente.

Grupo	Paciente	Cepa HiNT	Fecha aislamiento	Sexo	Edad	Enfermedad subyacente	PFGE
A	1	629	12/12/1997	Masc	64	Enfisema severo	Hi-44
		846	1/4/1998				Hi-43
		2302	8/3/2002				Hi-42
		2612	13/1/2003				Hi-41
	2	1702	19/10/2000	Masc	65	Enfisema severo	Hi-25
		2764	17/4/2003				Hi-26
	3	2133	29/12/2001	Fem	53	Bronquiectasia	Hi-17
		3513	8/2/2007				Hi-18
	4	2411	2/6/2002	Masc	68	EPOC ^b GOLD ^c IV	Hi-21
		3581	21/3/2007				Hi-20
	5	2222	4/2/2002	Fem	64	Apnea obstructiva del sueño, obesidad mórbida	Hi-30
		3419	14/3/2006				Hi-22
	6	1166	10/2/1999	Masc	60	EPOC GOLD IV	Hi-32
		2632	31/1/2003				Hi-31
B	7	313	8/12/1996	Masc	73	EPOC GOLD III	Hi-40
		772	24/2/1998				Hi-39
	8	1604	7/4/2000	Masc	51	EPOC GOLD III	Hi-45
		2319	17/3/2002				Hi-46
	9	459	26/6/1997	Masc	66	EPOC GOLD IV	Hi-33
		1299	10/5/1999				Hi-35
		2158	9/1/2002				Hi-36
	10	995	30/6/1998	Masc	38	EPOC GOLD IV	Hi-27
		2116	11/12/2001				Hi-10
	11	1656	30/4/2000	Masc	66	EPOC GOLD III	Hi-37
		2457	14/7/2002				Hi-38
	12	2125	19/12/2001	Masc	67	EPOC GOLD III	Hi-11
		2160	9/1/2002				Hi-12
	13	322	12/12/1996	Masc	68	EPOC	Hi-60
		865	14/4/1998				Hi-59
		1244	8/3/1999				Hi-58
		1715	16/11/2000				Hi-61
	14	2296	6/3/2002	Fem	27	Bronquiectasia	Hi-8
		2573	24/12/2002				Hi-6
		2659	25/2/2003				Hi-7
		3307	14/5/2005				Hi-9
B	15	832	24/3/1998	Masc	50	VIH, ADVP, Asma bronquial crónica	Hi-19
		955	29/5/1998				Hi-19
		1082	21/10/1998				Hi-19
	16	350	13/1/1997	Fem	72	Asma bronquial crónica	Hi-23
		573	13/10/1997				Hi-23

	1250	8/3/1999				Hi-23
17	411	17/2/1997	Masc	56	Bronquiectasia	Hi-13
	584	7/11/1997				Hi-13
	1104	9/11/1998				Hi-13
18	628	15/12/1997	Masc	69	EPOC GOLD III	Hi-55
	920	8/5/1998				Hi-55
19	735	10/2/1998	Fem	73	Bronquiectasia, pulmón fibroquístico	Hi-56
	1340	15/6/1999				Hi-57
	1684	3/10/2000				Hi-57
20	1689	10/10/2000	Fem	66	Carcinoma células escamosas pulmonares, bronquiectasis	Hi-50
	2378	25/04/2002				Hi-51
	2738	03/04/2003				Hi-52
	2801	13/05/2003				Hi-52
	2875	15/9/2003				Hi-54

Tabla 8. Origen clínico de la colección de cepas utilizadas en el estudio realizado por Marti-Lliteras *et al.* (2011).

Datos clínicos	Nº de cepas (HUB/HSD)
EPOC	47 (30/17)
Otras enfermedades respiratorias crónicas	15 (7/8)
Fibrosis quística	6 (0/6)
Bronquiectasias	4 (3/1)
Enfermedad pulmonar parenquimática difusa	2 (1/1)
Asma crónica	1 (1/0)
Enfermedad pulmonar intersticial crónica	1 (1/0)
Pulmón policístico	1 (1/0)
Infecciones respiratorias	36 (20/16)
Neumonía	14 (6/8)
Bronquiolitis	1 (0/1)
Sinusitis	1 (1/0)
Bronquitis aguda	17 (12/5)
Traqueo-bronquitis aguda	2 (0/2)
Resfriado común	1 (1/0)
Infecciones no respiratorias	10 (5/5)
Conjuntivitis	4 (2/2)
Bacteriemia	1 (1/0)
Otitis media	2 (0/2)
Colonización en carcinoma pulmonar	3 (2/1)
Datos no accesibles	3 (2/1)

ANEXO II: PUBLICACIONES

- Morey P., Cano V., Marti-Lliteras P., **López-Gómez A.**, Regueiro V., Saus C., Bengoechea J.A., Garmendia J. (2011). Evidence for a non-replicative intracellular stage of nontypable *Haemophilus influenzae* in epithelial cells. *Microbiology*. Oct 7.
- Martí-Lliteras P*, **López-Gómez A***, Mauro S., Hood D.W., Viadas C., Calatayud L., Morey P., Servin A., Liñares J., Oliver A., Bengoechea J.A., Garmendia J. (2011). Nontypable *Haemophilus influenzae* displays a prevalent surface structure molecular pattern in clinical isolates. *Plos one*. 2011 June.
- **López-Gómez A.**, Cano V., Moranta D., Morey P., García del Portillo F., Bengoechea J.A., Garmendia J. (2012). Host cell kinases, $\alpha 5$ and $\alpha 1$ integrins, and Rac1 signalling on the microtubule cytoskeleton are important for non-typable *Haemophilus influenzae* invasion of respiratory epithelial cells. *Microbiology*. 2012

